



Kandidatspeciale

Charlotte Andersson

Förvärvat långt QT-syndrom hos hästar

- Effekten av oralt administrerat moxifloxacin



Handledare: Dan A. Klærke

Philip J. Pedersen

Rikke Buhl

Inlämnad: 2013-01-17

Förvärvat långt QT syndrom hos hästar

– Effekten av oralt administrerat moxifloxacin

Acquired long QT syndrome in horses

– The effect of orally administered moxifloxacin

Omslagsbild: En av försökshästarna som ingick i det kliniska försöket. Hästen har EKG-utrustning på.

Förord

Detta speciale som är värt 30 ECTS poäng har gjorts de senaste fem månaderna, och är det sista som saknas för ett fullständigt kandidatprogram inom Veterinärmedicin vid det Sundhedsvidenskablige Fakultet, Köpenhamns universitet.

Det har varit ett spännande projekt och det har varit intressant att för första gången kunna fördjupa sig inom ett begränsat område, som utgjorts av hjärtfysiologi med inriktning på hästens hjärta. Jag har blivit introducerad till att arbeta i ett laboratorium vilket jag tidigare endast gjort i mycket begränsad omfattning och dessutom har jag fått prova att planlägga och utföra ett kliniskt försök.

Ett stort tack ska riktas till mina handledare, Dan A. Klærke, Philip J. Pedersen och Rikke Buhl, som låtit mig göra detta spännande projekt. Jag vill tacka Zaida R. Rasmussen för hjälpen jag fått i laboratoriet samt för det moraliska stöd hon givit. Jag vill även tacka Christian Friis, Professor på Institutet for Veterinær Sygdomsbiologi/Biomedicin, Köpenhamns universitet, för hjälpen med att analysera blodproven. Jag vill också tacka Sine Bomskov för hennes hjälp vid det kliniska försöket på häst.

Avslutningsvis vill jag tacka min familj för deras stöd och support, som har underlättat för mig så att jag har kunnat koncentrera mig på mina studier.

Abstract

Long QT syndrome (LQTS) can be induced by drugs in humans. LQTS may develop into fatal heart arrhythmia. The fluoroquinolone antibiotic moxifloxacin is associated with acquired LQTS in humans. Whether horses can acquire drug induced LQTS is yet unknown.

The aim of the study was to investigate the effect of moxifloxacin on equine KCNH2 channels heterologous expressed in *Xenopus* oocytes. The aim was also to investigate if orally administered moxifloxacin in horses give rise to a prolongation of the QTc interval (heart rate corrected QT interval).

The effect of different concentration of moxifloxacin (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M and 1 mM) on KCNH2 current were studied using two electrode voltage clamp (TEVC) at room temperature in *Xenopus* oocytes expressing KCNH2 channels. Oral administration of moxifloxacin (5,8 mg/kg body weight) to horses were studied in a randomized, blind, placebo-controlled, single-dose, 2-period, crossover study. ECG recordings were used to manually measure the QT intervals. The plasma concentration of moxifloxacin was evaluated by analyzing blood samples using reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection.

The outcome of the study showed a mean inhibition of the KCNH2 current at 34,8 ($\pm$ 19,8) % at 1 mM moxifloxacin. The result was not significant. Furthermore, a tendency of an increase in the placebo-adjusted mean change from baseline of the QTc interval ($\Delta\Delta$ QTc) was shown. However, this increase was not significant at any time during the study. The mean maximum plasma concentration of moxifloxacin was 2,26 ($\pm$ 0,17) μ g/ml and was observed 30 minutes after the moxifloxacin administration.

The moxifloxacin inhibition of the KCNH2 current was not significant due to the low numbers of oocytes and the great deviation of the recordings. Despite the non-significant result, there was an inhibition of the KCNH2 current which may indicate that moxifloxacin suppresses the KCNH2 channel in vivo. There was an equal absorption of moxifloxacin in all of the horses in the study. The study cannot conclude that orally administered moxifloxacin give rise to acquired LQTS due to the great deviation of the data and the non-significant effect on $\Delta\Delta$ QTc.

Sammanfattning

Humant kan läkemedel inducera långt QT-syndrom (LQTS). LQTS kan ge anledning till fatal hjärtarytmi. Moxifloxacin är ett fluorokinolonantibiotika som ger anledning till förvärvat LQTS humant. Hästars mottaglighet för läkemedelsinducerat LQTS finns ännu ej beskrivet.

Syftet med undersökningen var att utforska effekten av moxifloxacin på hästens KCNH2-kanaler heterologt uttryckta i *Xenopus*-oocyter. Syftet var även att undersöka om en förlängning av QTc-intervallet (QT-intervall korrigerat för hjärtfrekvens) kan induceras hos hästar genom administration av moxifloxacin.

Metoden som användes var att mäta strömmen genom hästens KCNH2-kanaler heterologt uttryckta i *Xenopus*-oocyter med "two electrode voltage clamp" (TEVC) vid rumstemperatur. Detta gjordes för att undersöka inhiberingsgraden av olika koncentrationer av moxifloxacin (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M och 1 mM). Vid ett kliniskt försök på hästar administrerades moxifloxacin (5,8 mg/kg kroppsvikt) oralt med samtidig EKG-upptagning och blodprovstagning. Detta utfördes genom en tvärsnittsstudie som var randomiserad, blind, placebokontrollerad, engångsdosering och två periodsindeldad. QT-intervallet på EKG-upptagningarna mättes manuellt vid bestämda tidpunkter och blodprovet analyserades med hjälp av "reverse-phase high-performance liquid chromatography" (HPLC) med fluorescens detektion.

Resultatet uppvisade en genomsnittlig inhibering av de heterologt uttryckta häst KCNH2-kanalerna som var 34,8 ($\pm$ 19,8) % vid en moxifloxacin koncentration på 1 mM. Dock var resultatet inte signifikant. Trots en tendens till en ökning kunde det inte påvisas någon signifikant ökning av den genomsnittliga placebokorrigerade förändringen från "baseline" av QTc-intervallet ($\Delta\Delta$ QTc) hos hästarna. Den högsta blodkoncentrationen uppmättes 30 minuter efter moxifloxacinbehandlingen och den var i genomsnitt 2,26 ($\pm$ 0,17) μ g/ml.

Någon signifikant inhibering på hästens KCNH2-kanaler av moxifloxacin kunde inte påvisas på grund av det låga antalet oocyter och den stora spridningen av data trots att en viss inhibering observerades. Inhiberingen som observerades indikerar att moxifloxacin kan ha en inhiberande effekt på KCNH2-kanalen även in vivo. Oralt administrerat moxifloxacin absorberades väl hos samtliga hästar i försöket. Till en följd av den stora spridningen av data samt att ingen signifikant

effekt på $\Delta\Delta QTc$ kunde observeras kan denna studie inte konkludera att oralt administrerat moxifloxacin till hästar ger upphov till förvärvat LQTS.

Förkortningar

bp	baspar
Ca^{2+}	kalciumjoner
Cav-kanaler	spänningskänsliga kalciumkanaler
CHO	“Chinese hamster ovary”
C_{max}	maximal plasma koncentration
EAD	tidig-efter-depolarisation
eag	“ether-a-go-go”
E_K	kaliums jämviktspotential
EKG	elektrokardiografi
HEK293	“human embryonic kidney 293”
HPLC	”reverse-phase high-performance liquid chromatography”
I_{Na}	natriumström
I_{K1}	ström genom inåtriktade kaliumkanaler
$I_{K\text{r}}$	snabb försenad utåtriktad K^+ -ström
$I_{K\text{s}}$	långsam försenad utåtriktad K^+ -ström
$I_{K\text{ur}}$	snabbt aktiverande, långsamt inaktiverande, utåtriktad K^+ -ström
I_{to}	övergående, utåtriktad K^+ -ström
$I_{\text{to,f}}$	snabb, övergående, utåtriktad K^+ -ström
$I_{\text{to,s}}$	långsam, övergående, utåtriktad K^+ -ström

IC ₅₀	koncentration som ger 50 % inhibering
K ⁺	kaliumjoner
K _{ATP} -kanaler	inåtriktade kaliumkanaler som inhiberas av ATP
kb	kilobaspar
Kir-kanaler	inåtriktade kaliumkanaler
Kv-kanaler	spänningskänsliga kaliumkanaler
LQTS	långt QT syndrom
Na ⁺	natriumjoner
Nav-kanaler	spänningskänsliga natriumkanaler
PVK	perifer venkateter
pXOOM	”plasmid-vector <i>Xenopus</i> oocyte or mammalian”
QTc-intervall	QT-intervall korregerat för hjärtfrekvens
ΔQTc	QTc-intervall korregerat för “baseline”
ΔΔQTc	skillnad mellan ΔQTc för placebo och moxifloxacin
QT-studie	QT/QTc-studie
SD	standardavvikelse
SEM	standardfel
TdP	torsades de pointes
TEVC	”two electrode voltage clamp”
T _{max}	tid intill maximal blodkoncentration föreligger

Innehållsförteckning

INLEDNING.....	1
TEORETISK BAKGRUND.....	2
Kardiovaskulär anatomi och fysiologi	2
Ventriklarnas aktionspotential.....	5
Jonkanaler i hjärtat involverade i ventriklarnas aktionspotential.....	7
Na ⁺ -kanaler	7
Ca ²⁺ -kanaler	8
K ⁺ -kanaler	9
KCNH2-kanalen	13
K⁺-kanaler i hästens hjärta.....	16
EKG	17
Långt QT-syndrom (LQTS).....	19
Grundlig QT-studie	21
Heterolog expression	22
SYFTE.....	23
METOD.....	24
Heterolog expression av hästens KCNH2-kanal och elektrofysiologi	24
Uppformering av DNA med Maxi-kit.....	24
Gelelektrofores till visualisering av DNA och mRNA	24
Skärning av DNA plasmiderna	24
Upprensning av DNA	25
In vitro transkription	25
<i>Xenopus</i> -oocyter	25
Injektion av mRNA i <i>Xenopus</i> -oocyter.....	26
Elektrofysiologi	26
Klinisk moxifloxacinstudie på häst	28
Försökshästar	28
Behandling.....	28
Blodprov	29
EKG-upptagning och analysering	29
Statistik	30
RESULTAT	31
Heterolog expression av hästens KCNH2-kanal och elektrofysiologi	31
Klinisk moxifloxacinstudie på häst	33

DISKUSSION	38
Heterolog expression av hästens KCNH2-kanal och elektrofysiologi	38
Anmärkningsvärda mätningar på oocyter	41
Klinisk moxifloxacinstudie på häst	43
Korrektion och variation av QT-intervallet.....	43
Avläsning av EKG	44
Moxifloxacin i plasma	45
Uppföljning av hästarna	47
Kön	48
Andra läkemedel som kan undersökas	48
Hästar och läkemedelsinducerat LQTS.....	49
KONKLUSION	50
PERSPEKTIVERING	51
REFERENSER.....	52
BILAGA I - EKG PROTOKOLL	60
BILAGA II - PROTOKOLL FÖR MÄTNING AV QT-INTERVALL.....	61

Inledning

Långt QT syndrom (LQTS) är ett tillstånd som karaktäriseras av störningar i hjärtats elektriska aktivitet som leder till att ventriklarnas repolarisation blir förlängd, vilket ger ett förlängt QT-intervall på en EKG-upptagning (Witchel & Hancox 2000). LQTS är förknippat med episoder av synkop, livshotande hjärtarytmier inklusive torsades de pointes och plötslig hjärtdöd. Humant vet man att LQTS kan induceras av vissa läkemedel. Ett antal läkemedel har blivit borttagna från marknaden eller fått stränga restriktioner i sin distribution på grund av att de kan ge anledning till LQTS humant. När läkemedel blir borttagna från marknaden försvinner även potentiella läkemedel som används inom veterinärmedicin, som exempel kan nämnas cisapride till behandling av post-operativ ileus hos häst (Finley et al 2003). Sedan år 2005 ska alla nya läkemedel genomgå en så kallad grundlig QT-studie, där deras effekt på det humana QTc-intervallet undersöks.

Bortsett från ett fall där en häst fått torsades de pointes inducerat av behandling med quinidine (ett antiarytmiskt läkemedel) (Reef et al 1995), finns läkemedelsinducerat LQTS inte beskrivet hos häst. Det är ännu ej beskrivet hur pass mottagliga hästar är för läkemedelsinducerat LQTS.

I detta examensarbete undersöks effekten av moxifloxacin på hästens KCNH2-kanaler.

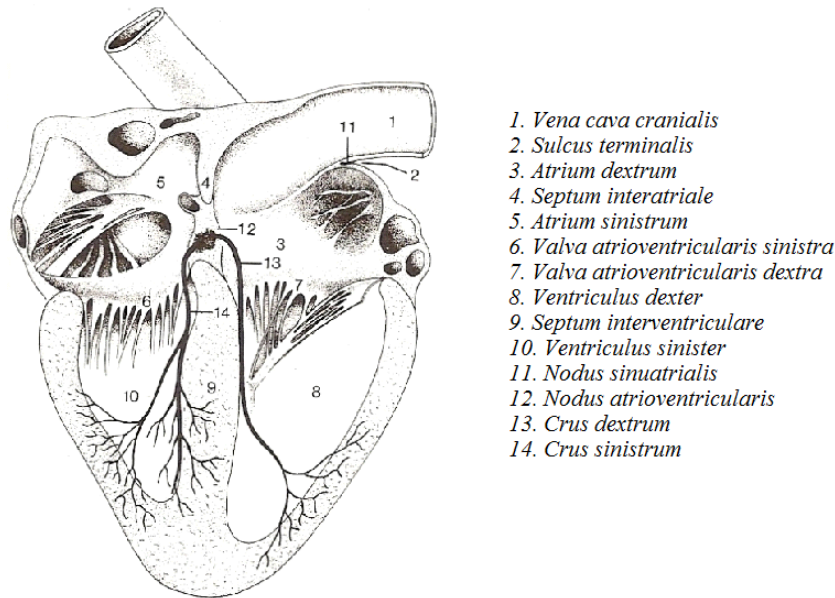
Moxifloxacin är ett fluorokinolonantibiotika som blockerar den humana KCNH2-kanalen som är viktig för ventriklarnas repolarisation (Bischoff et al 2000). Moxifloxacin ger en väl karaktäriserad förlängning av QT-intervallet humant (Démolis et al 2000, White et al 2001, Noel et al 2003) och används som positiv kontroll i grundliga QT-studier. Arbetet är utöver en litteraturstudie uppdelat i två delar. En laboratoriedel där effekten av moxifloxacin på heterologt uttryckta häst KCNH2-kanaler undersöktes. Därefter genomfördes ett kliniskt försök för att undersöka effekten av moxifloxacin på QT-intervallet hos häst. Målet med studien var att undersöka om förvärvat LQTS kan induceras hos häst vid administration av ett läkemedel.

Teoretisk bakgrund

Kardiovaskulär anatomi och fysiologi

Kardiovaskulär fysiologi innefattar funktionen av hjärtat, blodkärlen och blodet. Det kardiovaskulära systemets primära funktion är transport. Blodet transporterar bland annat livsviktiga substanser, som syre och näringsämnen till varje cell i kroppen, men transporterar även koldioxid och andra metaboliska avfallsprodukter från cellerna till lungorna, njurarna eller levern där de utsöndras (Cunningham and Klein 2007). Hjärtat är ett vitalt organ vars rytmiska kontraktion upprätthåller ett konstant blodflöde genom blodkärlen. Ett exempel som kan nämnas för att förstå hjärtats viktiga funktion är att om blodtillförseln till hjärnan stoppas blir en person medvetslös inom 5-10 sekunder, efter 5-10 minuter uppstår permanenta hjärnskador (Silverthorn 2007). För att hjärtat ska kunna upprätthålla ett konstant blodflöde är det viktigt att hjärtats kontraktion är koordinerad och sker efter ett visst mönster.

Hästar är storartade atleter med ett mycket kompatibelt kardiovaskulärt system. Deras hjärtfrekvens kan variera inom ett intervall från 20 till 240 slag per minut (Young 2003). Slagvolymen som principiellt avgörs av hjärtats storlek (Young 2003) varierar mellan 2-2,5 ml/kg vid vila till 2,4-4,2 ml/kg vid träning, vilket hos en medelstor häst på 500 kg motsvarar 1000-1250 ml vid vila och 1200-2100 ml vid träning (Evans & Young 2010). Deras hjärtfrekvens och hjärtminutvolym ökar snabbt vid träning vilket möjliggör en snabb ökning i syrekonsumtionen. Ökning av hjärtfrekvens samtidigt med en ökning i slagvolym gör att tränade hästar kan ha en maximal hjärtminutvolym (slagvolym*hjärtfrekvens) på $>0,6$ l/minut/kg vilket hos en 500 kg häst är över 300 l/minut (Evans & Young 2010). Ett normalt fungerande hjärta som kan upprätthålla en ökning i blodflödet är fundamentalt för hästarnas atletiska prestation. I figur 1 ses delar av hjärtats anatomiska struktur som är viktiga för dess funktion.



Figur 1: Bild på hjärtats anatomi med dess fyra kamrar och delar av retledningssystemet (Dyce et al 2007).

Hjärtat, *cor*, är delat i två funktionella halvor av en central skiljevägg, *septum interatriale et interventrikulare*. Varje hjärthalva fungerar som en oberoende pump, höger hjärthalva består av *atrium et ventriculus dexter* och vänster hjärthalva består av *atrium et ventriculus sinister*. Venöst deoxygenerat blod från kroppens vävnader och organ kommer via *vena cava cranialis et caudalis* till *atrium dextrum* varifrån blodet flödar in i *ventriculus dexter* som under relativt lågt tryck (typiskt omkring 20mmHg) pumpar blodet ut i lungkretsloppet via *truncus pulmonalis* (som delar sig i *arteria pulmonalis dextra et sinistra*). I lungorna blir blodet oxygenerat och kommer via *venae pulmonales* till *atrium sinistrum*. Härifrån flödar blodet till *ventriculus sinister* som under högt tryck (typiskt omkring 120 mmHg) pumpar blodet ut i det systemiska kretsloppet via *aorta* som förgrenas till mindre artärer och slutligen kapillärer som försörjer kroppens vävnader och organ med oxygenerat blod. De första förgreningarna från *aorta* är *arteria coronaria dextra et sinistra* som försörjer hjärtat med oxygenerat blod. Blodets riktning inuti hjärtat säkras genom *valva atrioventricularis dextra et sinistra* medan *valva trunci pulmonalis* och *valva aortae* säkrar att blodet blir i blodkärlen efter att det lämnat hjärtat. Varje hjärtcykel kan indelas i två faser, diastolen är när hjärtmuskeln är avslappnad och systolen är när hjärtmuskeln kontraherar. Drivkraften på blodet i blodcirkulation är den tryckskillnad som uppstår på grund av hjärtats rytmiska kontraktioner (Cunningham & Klein 2007, Schaller 2007, Silverthorn 2007).

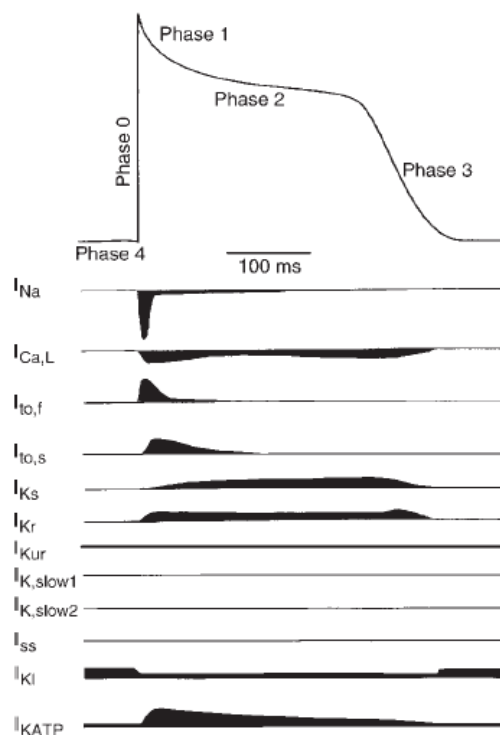
Hjärtmuskulaturen är liksom skelettmuskulaturen en tvärstrimmig muskulatur med myofibriller. Dock föreligger vissa skillnader. Bland annat är hjärtats muskelceller, kardiomyocyterna, organiserade i ett förgrenat nätverk där individuella myocyter förgrenats och är förbundna med intilliggande myocyter genom så kallade ”intercalated disks”. ”Intercalated disks” har två komponenter, nämligen desmosomer och ”gap junctions”. Desmosomer är transmembrana protein som förbinder cellerna mekaniskt till varandra. ”Gap junctions” är små öppna kanaler varigenom positiva joner kan flöda och därigenom är kardiomyocyterna elektriskt förbundna med varandra (Dellman & Eurell 1998). Denna uppbyggnad gör att närliggande kardiomyocyter kontraherar synkroniserat vid excitation (Cunningham & Klein 2007, Silverthorn 2007). Den process där elektrisk excitation efterföljs av kontraktion av myocyter och därmed hjärtat, kallas excitation-kontraktionskoppling (Bers 2002).

Cirka 1 % av kardiomyocyterna har förmågan att spontant bilda ett aktionspotential, som via ”gap junctions” sprids i en riktning över hjärtat med kontraktion av de fyra hjärtkamrarna som resultat. Dessa celler kallas för pacemakerceller eftersom de initierar hjärtslag och bestämmer hjärtfrekvensen. Hjärtats mekaniska aktivitet kontrolleras av interna impulser men dessa kan moduleras av det autonoma nervsystemet. De pacemakerceller som under normala fysiologiska förhållande initierar hjärtats aktionspotential finns i *nodus sinuatrialis* (sinusknutan) belägen i *sulcus terminalis* nära *ostium venae cavae cranialis* i väggen av *atrium dextrum* (se figur 1). Härifrån sprids aktionspotentialen över atrierna till *nodus atrioventricularis* (AV-knutan) placerad i *septum interventriculare* nära öppningen av *sinus coronarius*. Aktionspotentialen kan endast spridas från atrierna till ventriklarna genom AV-knutan eftersom atrierna och ventriklarna är elektrisk isolerade från varandra genom ett bindvävslager som bildar *trigona fibrosa* och *anuli fibrosi*. I AV-knutan fördröjs aktionspotentialen genom att ledas med en hastighet som är 1/20 av den som ses i atrierna, på grund av långsammare elektrisk ledning mellan cellerna. Denna fördröjning tillåter atrierna att kontrahera och fylla ventriklarna det sista, innan dessa nås av impulsen och kontraherar. Från AV-knutan fortsätter aktionspotentialen till ventriklarna via specialiserade celler som kallas Purkinjefibrer och har mycket snabb elektrisk ledning (upp till 4 m/s). Dessa löper i *fasciculus atrioventricularis* som löper ner i *septum interventriculare* och förgrenas till *crus dextrum et sinistrum* som fortsätter ner till *apex cordis*. Härifrån förgrenas de ut i mindre Purkinjefibrer som snabbt sprider impulsen ut genom ventriklarnas väggar från *apex cordis* i riktning mot *basis cordis*. Denna impulsspridning genom hjärtat samt kardiomyocyternas elektriska förbindning via ”gap

junctions” är grundläggande för att få en koordinerad kontraktion som resulterar i att hjärtat pumpar blodet runt i blodkärlen (Dyce et al 2007, Schaller 2007, Silverthorn 2007).

Ventriklarnas aktionspotential

Hjärtats mekaniska pumpfunktion är beroende av en normalt fungerande elektrisk aktivitet i hjärtat, där aktivering sker i specialiserade pacemakerregioner med efterföljande propagering av aktiviteten till ventriklarna. Den elektriska aktiviteten tillskrivs hjärtats aktionspotential. Hjärtats aktionspotential avspeglar aktivering och inaktivering av jonkanaler som leder depolariserande inåtriktade (Na^+ och Ca^{2+}) och repolariserande utåtriktade (K^+) jonströmmar (Niwa & Nerbonne 2010). För att hjärtat ska fungera normalt är det viktigt att de jonkanaler som tillsammans åstadkommer ett aktionspotential fungerar korrekt. Heterogeniteten av aktionspotentialens vågform i olika regioner av hjärtat avspeglar skillnader i uttryck av olika jonkanaler (Nerbonne & Kass 2005). Figur 2 nedan visar hur ett aktionspotential ser ut i ventriklarnas myocyter humant.



Figur 2: Övre delen visar vågformen på ett aktionspotential i ventriklarna humant och dess indelning i olika faser. Nedre delen visar bakomliggande jonströmmar (Nerbonne & Kass 2005).

Den övre delen av figur 2 visar hur ett aktionspotential är indelat i olika faser och den undre delen visar de bakomliggande jonströmmarna. Ett aktionspotential är indelat i fem olika faser (numrerade 0-4) som vardera karaktäriseras av olika jonströmmar.

Fas 4 är när myocyterna befinner sig vid vilomembranpotential. Vilomembranpotentialen ligger stabilt omkring -90 mV, vilket approximerar K^+ jämviktspotential (E_K) uträknat enligt Nernst ekvation, och myocyterna förblir i denna fas tills de stimuleras av en elektrisk impuls (Silverthorn 2007). I detta stadiet är de inåtriktade K^+ -kanalerna (K_{ir} -kanalerna) aktiva (Nerbonne & Kass 2005).

Fas 0 utgörs av en snabb depolarisering som orsakas av en inåtriktad ström av Na^+ (I_{Na}). De spänningskänsliga Na^+ -kanalerna (Na_v -kanaler) har ett tröskelvärde på cirka -55 mV, och vid stimuli som depolariserar membranet till denna nivå så öppnas Na_v -kanalerna, Na^+ -joner flödar in i cellen vilken depolariseras. Både aktivering och inaktivering av Na_v -kanaler är spänningsberoende, och inaktivering sker snabbt när membranpotentialen når över + 20 mV (Nerbonne & Kass 2005, Silverthorn 2007).

Fas 1 är en övergående, kortvarig repolarisationsfas som uppkommer av inaktivering av Na^+ -kanalerna och aktivering av den snabbt övergående, utåtriktade strömmen av K^+ -joner ($I_{to,f}$). $I_{to,f}$ aktiveras snabbt vid membrandepolarisering till -30 mV. (Nerbonne & Kass 2005).

Fas 2 kallas även för platåfasen. Depolariseringen aktiverar även spänningskänsliga Ca^{2+} -kanaler (Ca_v -kanaler) vilket leder till att Ca^{2+} -joner flödar in genom typ L Ca_v -kanaler. Platåfasen uppkommer genom en balans mellan den utåtriktade strömmen av K^+ -joner och den inåtriktade strömmen av Ca^{2+} -joner. (Nerbonne & Kass 2005) Inflöde av Ca^{2+} -joner är viktigt för att trigga igång excitation-kontraktionskoppling (Bers 2002).

Fas 3 uppstår när Ca_v -kanalerna inaktiveras och den utåtriktade strömmen av K^+ -joner dominerar vilket resulterar i repolarisation (fas 3). K^+ -kanaler ligger bakom repolarisationen av aktionspotentialen. Drivkraften på den utåtriktade strömmen av K^+ -joner är hög under platåfasen och aktivering av de försenade K^+ -strömmarna I_{Kr} och I_{Ks} leder till repolarisation av membranpotentialen tillbaka till vilomembranpotential. (Nerbonne & Kass 2005, Cunningham & Klein 2007)

Jonkanaler i hjärtat involverade i ventriklarnas aktionspotential

För att kunna förstå hur en substans kan påverka hjärtats elektrofysiologi är det viktigt att ha kännedom om de betydande jonkanaler som är involverade i hjärtats depolarisering och repolarisering. I detta avsnitt beskrivs de essentiella jonkanalerna involverade i ventriklarnas aktionspotential humant. Under rubriken ”*K⁺-kanaler i hästens hjärta*” kommer en beskrivning av de kaliumkanaler som är involverade i ventriklarnas repolarisation hos hästar. Fokus kommer att ligga på KCNH2-kanalen eftersom det är denna som undersöks i detta arbete och en mer detaljerad beskrivning av dess funktion kommer under rubriken ”*KCNH2-kanalen*”.

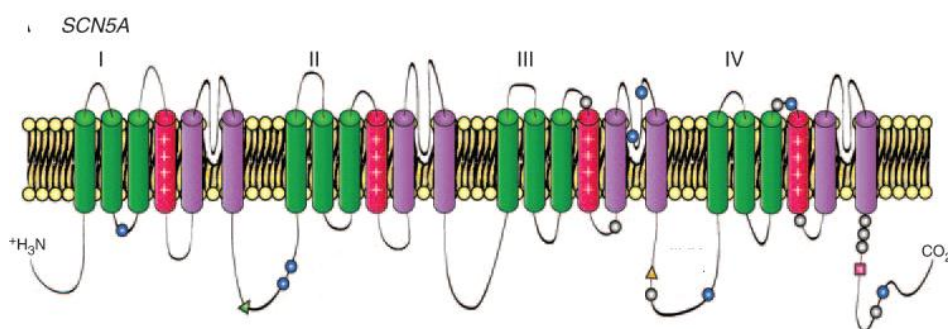
Na⁺-kanaler

Spänningskänsliga Na⁺-kanaler (Nav-kanaler) karaktäriseras av att aktiveras och inaktiveras snabbt vid membrandepolarisering, och de ligger bakom fas 0 depolariseringen i hjärtats aktionspotential. Nav-kanalerna är högt selektiva för Na⁺ och har ett aktiveringströskelvärde på cirka -55 mV (Nerbonne & Kass 2005). Nav-kanalerna inaktiveras snabbt (få millisekunder) efter aktiveringen när membranpotentialen når över +20 mV (Silverthorn 2007), de är sedan inaktiverade tills membranet är hyperpolariserat (Ashcroft 2000).

Nav-kanaler består av en α -subenhet samt en eller flera mindre β -subenheter (Ashcroft 2000). När α -subenheten uttrycks i heterologa system har Nav-kanalerna fungerande aktivitet vilket indikerar att den har de nödvändiga elementen för att bilda en jonkanal. Däremot behövs β -subenheter för att Nav-kanalerna ska fungera normalt (Catterall 2000a). Nav-kanaler tillhör en stor genfamilj med flera olika α - och β -subenheter, den α -subenhet som huvudsakligen finns i myokardiet hos däggdjur kodas av genen SCN5A. Tre olika Nav β -subenheter har identifierats ($\beta 1$, $\beta 2$ och $\beta 3$), vilka alla förmodligen uttrycks i hjärtat. Mycket tyder på att Nav-kanaler i hjärtat består av en α -subenhet och en till två β -subenheter (Nerbonne & Kass 2005). Mutationer av i den humana SCN5A-genen, som leder till ökad Na⁺-ström och därmed förlängning av aktionspotentialen, är kopplat till LQT3, en form av långt QT syndrom (LQTS) (Bennet et al 1995).

Nav-kanalernas α -subenheter tillhör ”S4”-superfamiljen av spänningskänsliga jonkanalsgener, vartill även andra spänningskänsliga jonkanaler, till exempel kalium- och kalciumkanaler, med liknande strukturella uppbyggnad tillhör (Nerbonne & Kass 2005). Nav-kanalernas α -subenheter är stora proteiner (cirka 2000 aminosyror) uppbyggda av fyra internt homologa domäner (I-IV) som vardera består av sex transmembrana α -helixar (S1-S6) (se figur 3) (Catterall 2000a). Slingorna som håller samman de fyra domänerna samt aminosyra-terminalen (N-terminalen) och

karboxylsyra-terminalen (C-terminalen) är belägna intracellulärt. S4 segmentet fungerar som den primära spänningssensorn i kanalen (Ashcroft 2000). Slingan som håller samman S5 och S6, går ner i membranet mellan S5 och S6, och bildar den yttre delen av poren. β -subenheterna består av ett transmembrant segment med en stor extracellulär glykosylerad N-terminal samt en liten intracellulär C-terminal (Catterall 2000a).



Figur 3: Porbildande α -subenhet av hjärtats Nav-kanaler. Membrantopologi av de fyra domänerna (I-IV) innehållande vardera sex transmembrana segment (S1-S6) (Nerbonne & Kass 2005).

Ca²⁺-kanaler

Spänningskänsliga Ca²⁺-kanaler (Cav-kanaler) förekommer i flera olika typer som klassificeras som T, L, N, P, Q och R, som skiljer sig åt både farmakologiskt, kinetisk och i sitt spänningsberoende (Ashcroft 2000, Catterall 2000b). Cav-kanaler indelas i två funktionellt olika sorters kanaler, som aktiveras vid låg (LVA Cav-kanaler) respektive hög (HVA Cav-kanaler) spänning (Nerbonne & Kass 2005). HVA Cav-kanaler aktiveras när membranpotentialen depolariserats till över -20 mV och de indelas i typerna L, N, P, Q och R, varav typ L är den som finns i ventriklarnas myocyter (Ashcroft 2000, Nerbonne & Kass 2005). Aktivering av typ L Cav-kanaler vid depolarisering är försenat jämfört med Nav-kanaler, och därför bidrar de inte nämnvärt till fas 0 i hjärtats aktionspotential. Aktivering av typ L Cav-kanalerna och inflöde av Ca²⁺-joner ligger däremot bakom platåfasen (fas 2) i ventriklarnas aktionspotential (Nerbonne & Kass 2005), samt triggar utskiljning av Ca²⁺-joner från intracellulära lager och triggar excitation-kontraktions koppling i kontraherande myocyter (Bers 2002). Typ L Cav-kanalerna genomgår en snabb inaktivering som är beroende av spänning och Ca²⁺-joner på membranets inre sida, och avgör därigenom längden på platåfasen i aktionspotentialen samt repolarisationens varighet (Nerbonne & Kass 2005).

Liksom för Nav-kanalerna så tillhör Cav-kanalernas porbildande α_1 -subenhet "S4"-superfamiljen av spänningskänsliga jonkanalsgener, och har samma strukturella uppbyggnad som Nav-kanalernas α -subenhet (se figur 3) (Catterall 2000b). Typ L Cav-kanalens α -subenhet kallas Cav1.2 och kodas av genen CACNA1C (Hedley et al 2009). Utöver Cav1.2 finns de accessoriska subenheterna Cav β och Cav $\alpha_2\delta$ uttryckta i myokardiet och bidrar till bildandet av funktionella Cav-kanaler (Nerbonne & Kass 2005). Mutation i den humana CACNA1C-genen ligger bakom Timothy syndromet även kallat LQT8, det vill säga en form av LQTS. Mutationen leder till att den spänningsberoende inaktiveringsmekanismen går förlorad vilket resulterar i förlängd Ca^{2+} -ström under plåtåfasen och därmed en försenad repolarisation (Splawski et al 2004).

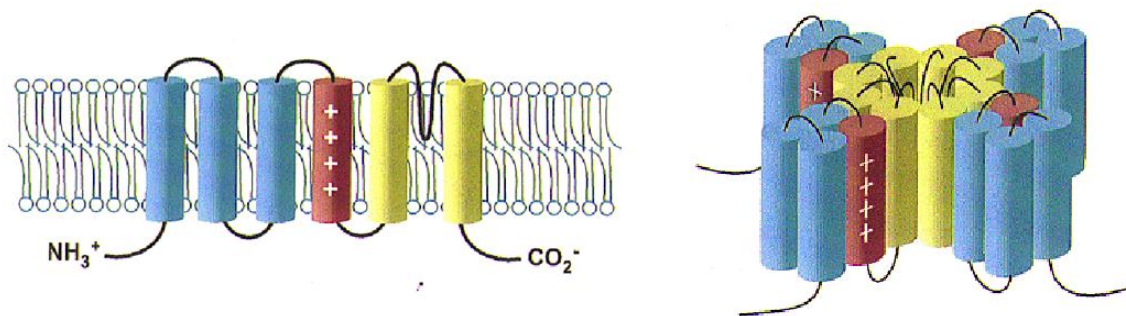
K⁺-kanaler

I kontrast till Nav- och Cav-kanaler så förekommer det flera spänningsberoende K⁺-kanaler (Kv-kanaler) och icke spänningsberoende inåtriktade K⁺-kanaler (Kir-kanaler), som är involverade i repolarisation av ventriklarnas aktionspotential. Störst funktionell spridning är det på strömmarna genom Kv-kanalerna. Åtminstone två typer av övergående utåtriktade K⁺-strömmar, $I_{\text{to},f}$ och $I_{\text{to},s}$, och två typer av försenade utåtriktade K⁺-strömmar, I_{Kr} och I_{Ks} , har betydelse för ventriklarnas repolarisationen (Nerbonne & Kass 2005). De övergående utåtriktade K⁺-strömmar (I_{to}) som aktiveras och inaktiveras relativt snabbt ligger bakom den tidiga fasen av aktionspotentialens repolarisation medan de försenade utåtriktade K⁺-strömmarna (I_{K}) bidrar till den senare fasen av repolarisationen tillbaka till vilomembranpotential (Nerbonne 2000).

Spänningskänsliga K⁺-kanaler, Kv-kanaler

Liksom för Nav- och Cav-kanalerna tillhör Kv-kanalernas porbildande α -subenheter "S4"-superfamiljen av spänningskänsliga jonkanaler (Ashcroft 2000, Nerbonne & Kass 2005). Kv-kanalernas α -subenhet är ett protein bestående av sex transmembrana segment (S1-S6) med N- och C-terminalerna belägna intracellulärt (se figur 4) (Nerbonne & Kass 2005). I likhet med Nav- och Cav-kanaler har S4-segmentet positivt laddade aminosyror i var tredje position och utgör en spänningssensor som är involverad i aktiveringen av de spänningskänsliga K⁺-kanalerna (Ashcroft 2000). Slingan mellan S5-S6 går ner i membranet och bildar den yttre delen av kanalens por, kallas H5-regionen (Ashcroft 2000). H5-regionen innehåller signatursekvensen G(Y/F)G av aminosyrorna glycin (G) och tyrosin (Y) eller fenylalanin (F), och fungerar som K⁺ selektivt filter (Doyle et al 1998). Funktionella Kv-kanaler är uppbyggda av fyra α -subenheter (se figur 4) (Nerbonne & Kass 2005). Det finns ett stort antal gener för Kv-kanalers α -subenhet som indelas i underfamiljerna Kv1-

Kv9, KCNQ och de *eag*-liknande K^+ -kanalerna (Nerbonne & Kass 2005). Det stora antalet i medlemmar i de olika underfamiljerna, alternativ splicing av transkript samt det faktum att en Kv-kanal är uppbyggd av fyra α -subenheter som kan vara kombinationer av olika α -subenhetsprotein (bildning av heteromultimera kanaler), gör att det förekommer ett stort antal olika Kv-kanaler med olika elektrofysiologiska egenskaper (Nerbonne 2000). Förekomst av accessoriska subenheter bidrar ytterligare till att öka variationen i de elektrofysiologiska egenskaperna (Nerbonne 2000).



Figur 4: Till vänster visas membrantopologin för en porbildande α -subenhet av Kv-kanaler med sex transmembrana domäner (S1-S6). Till höger ses en schematisk illustration av hur fyra α -subenheter sitter samman för att bilda en K^+ -selektiv por (Nerbonne 2000).

Övergående utåtriktade K^+ -strömmar, $I_{to,f}$ och $I_{to,s}$, (Kv4.2, Kv4.3 och Kv1.4)

Övergående utåtriktad ström av K^+ -joner (I_{to}) är en betydande repolarisationsström i hjärtats ventrikler. I_{to} aktiveras och inaktiveras snabbt vid depolarisering av membranet, och ligger bakom fas 1 repolarisationen av ventriklarnas aktionspotential samt bidrar till bildning av platåfasen (fas 2) där det föreligger en balans mellan utflöde av K^+ -joner och inflöde av Ca^{2+} -joner. Heterogenitet av aktionspotentialens vågform i hjärtats olika regioner tillskrivs bland annat skillnader i densitet och egenskaper av I_{to} . I_{to} har två funktionella komponenter som båda aktiveras och inaktiveras snabbt, men som återhämtar sig olika snabbt från inaktivering. Den snabba komponenten, $I_{to,f}$, har en väldigt snabb återhämtningsperiod på omkring några hundratals millisekunder (50-380 ms), medan den långsamma komponenten, $I_{to,s}$, har en långsam återhämtningsperiod som sträcker sig över sekunder (Niwa & Nerbonne 2010). I_{Kur} är ytterligare en repolariserande utåtriktad K^+ -ström som bidrar till fas 2 och 3 av ventriklarnas aktionspotential hos en del djurarter, bland annat hos möss, råttor, marsvin och hästar (Finley et al 2003). Karaktäristiskt för I_{Kur} är att de har en väldigt snabb aktivering och inaktiveras väldigt långsamt (Finley et al 2003).

Kv-kanalerna har flera underfamiljer. Underfamiljerna Kv1-Kv4 bildar funktionella spänningsavhängiga K^+ -kanaler medan Kv5-Kv9 är elektriskt tysta kanaler (Nerbonne & Kass 2005). De porbildande α -subenheterna Kv4.2 (KCND2) och Kv4.3 (KCND3) ger upphov till $I_{to,f}$, medan α -subenheten Kv1.4 (KCNA4) ger upphov till $I_{to,s}$, och Kv1.5 (KCNA5) ger upphov till I_{Kur} (Nerbonne & Kass 2005). Ett flertal Kv-kanals accessoriska (β) subenheter har föreslagits vara med i bildningen av fungerande I_{to} -kanaler (Niwa & Nerbonne 2010). Av dessa har bara KCHIP2 visat sig spela en avgörande roll för normalt fungerande $I_{to,f}$ -kanaler (Kuo et al 2001).

Långsam försenad utåtriktad K^+ -ström, I_{Ks} (KCNQ)

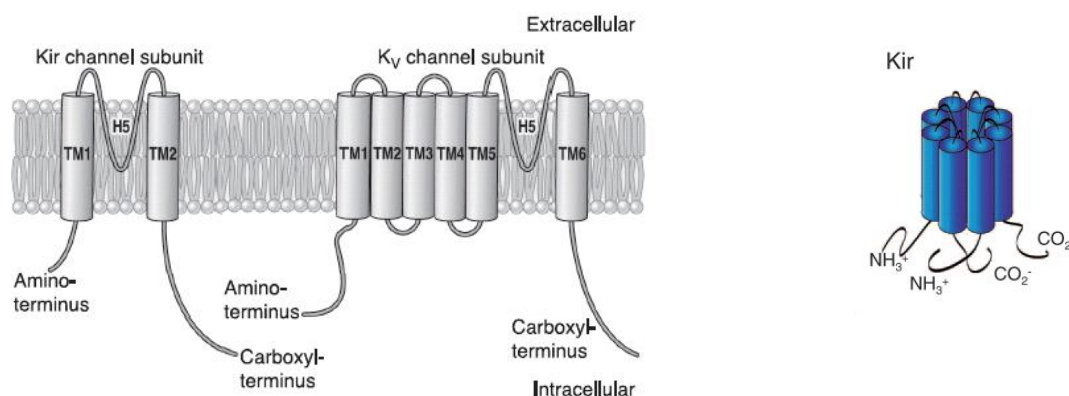
Av de olika KCNQ-generna kodar KCNQ1 för den α -subenhet (Kv7.1) som uttrycks i hjärtat och som ligger bakom den långsamma försenade utåtriktade K^+ -ström (I_{Ks}) som bidrar till repolarisering av hjärtats aktionspotential (Nerbonne & Kass 2005). Upptäckten av den humana KCNQ1, tidigare kallad K_vLQT1 , skedde på grund av dess involvering i det långa QT-syndromet som kallas LQT1 (Wang et al 1996). Vid heterolog expression av enbart KCNQ1 fås en snabbt aktiverad utåtriktad ström av K^+ -joner som inte stämmer överens med I_{Ks} (Barhanin et al 1996, Sanguinetti et al 1996). Däremot ger samtidig expression av KCNQ1 med den accessoriska subenheten minK anledning till en K^+ -ström med dubbelt så stor amplitud som K^+ -strömmen vid enbart expression av KCNQ1, och som är en långsamt aktiverad utåtriktad K^+ -ström vilket stämmer överens med I_{Ks} (Barhanin et al 1996, Sanguinetti et al 1996). Den accessoriska subenheten minK kodas av genen KCNE1 (Nerbonne & Kass 2005).

Snabb försenad utåtriktad K^+ -ström, I_{Kr} (KCNH2)

KCNH2 kodar för den snabba försenade utåtriktade K^+ -strömmen (I_{Kr}) (Sanguinetti et al 1995). Molekylärt består jonkanalsproteinet av α -subenheten Kv11.1 som tidigare kallades ERG1 (Charpentier et al 2010). Den humana KCNH2 identifierades genom dess homologi med en K^+ -kanalsgen hos *Drosophila melanogaster* benämnd "ether-a-go-go"-gen (eag-gen) (Warmke & Ganetzky 1994). KCNH2 är inte den mänskliga motsvarigheten till eag-genen, men kallas på grund av likheten med eag-genen *human eag-relaterad gen* (HERG) (Warmke & Ganetzky 1994). Curran et al (1995) upptäckte att den humana KCNH2, som uttrycks starkt i hjärtat, är involverad i LQT2 formen av LQTS och den förmodades koda för en K^+ -kanal med stor betydning för repolarisation av hjärtats aktionspotential. Mer om denna kanal under rubriken "*KCNH2-kanalen*".

Inåtriktade K^+ -kanaler (Kir-kanaler, I_{K1})

Utöver de Kv-kanaler som aktiveras vid depolarisering finns icke spänningsberoende inåtriktade K^+ -kanaler (Kir-kanaler) som ger anledning till hjärtats I_{K1} -ström (Nerbonne & Kass 2005). Det förekommer rikligt med Kir-kanaler i ventriklarnas myocyter. Det finns flera underfamiljer av Kir-kanalernas porbildande α -subenhet, de som uttrycks i hjärtat och bidrar till I_{K1} tillhör underfamiljen Kir2. Kir-kanalernas α -subenhet består av två transmembrana domäner (TM1 och TM2) sammankopplade med en porbildande slinga (H5-regionen) och intracellulära N- och C-terminaler (se figur 5). H5-regionen utgör det K^+ -selektiva filtret liksom hos Kv-kanaler. Kir-kanalerna saknar S4-spänningscensorsegmentet och är därför inte sensitiv för spänning över membranet som de spänningskänsliga jonkanalerna. Bakgrunden till Kir-kanalernas karaktäristiska K^+ -ström är en intracellulär fysisk blockad av kanalporen med katjoner så som Mg^{2+} och polyaminer, som förhindrar utåtriktad ström av K^+ -joner vid depolarisering till positivt membranpotential. Funktionella Kir-kanaler är uppbyggda av fyra α -subenheter (se figur 5) (Hibino et al 2010).



Figur 5: Till vänster: Skillnad på α -subenheter hos Kir-kanaler och Kv-kanaler (Hibino et al 2010). Till höger: Fyra α -subenheter har gått samman och bildar en Kir-kanal (Nerbonne & Kass 2005).

Som namnet antyder (inåtriktade) är Kir-kanaler bättre på att bära inåtriktade än utåtriktade K^+ -strömmar (Hibino et al 2010). Vid membranpotential mer negativt än K^+ -jämnviktpotential flödar en stor K^+ -ström in genom kanalerna, och när membranpotentialen är mer positivt än K^+ -jämnviktpotential flödar en relativt stor K^+ -ström ut genom kanalerna. Detta är viktigt för att hålla myocyternas vilomembranpotential nära K^+ -jämnviktpotential (Hibino et al 2010). I_{K1} minskar ju mer depolariserat membranet blir, för att praktiskt taget vara noll vid positivt membranpotential. Avsaknaden av K^+ -ström genom Kir-kanalerna vid aktionspotentialens platåfas då det föreligger ett positivt membranpotential bidrar till att bibehålla depolarisationen. Repolarisation initieras av Kv-kanalerna och när den når negativt membranpotential bidrar I_{K1} -strömmen till den avslutande delen

av repolarisationen (Hibino et al 2010). Mutation i den humana KCNJ2-genen som kodar för Kir2.1 ligger bakom Andersens syndrom, en human multisystemisk sjukdom som bland annat kan innebära förlängt QT intervall (LQT7) (Hedley et al 2009).

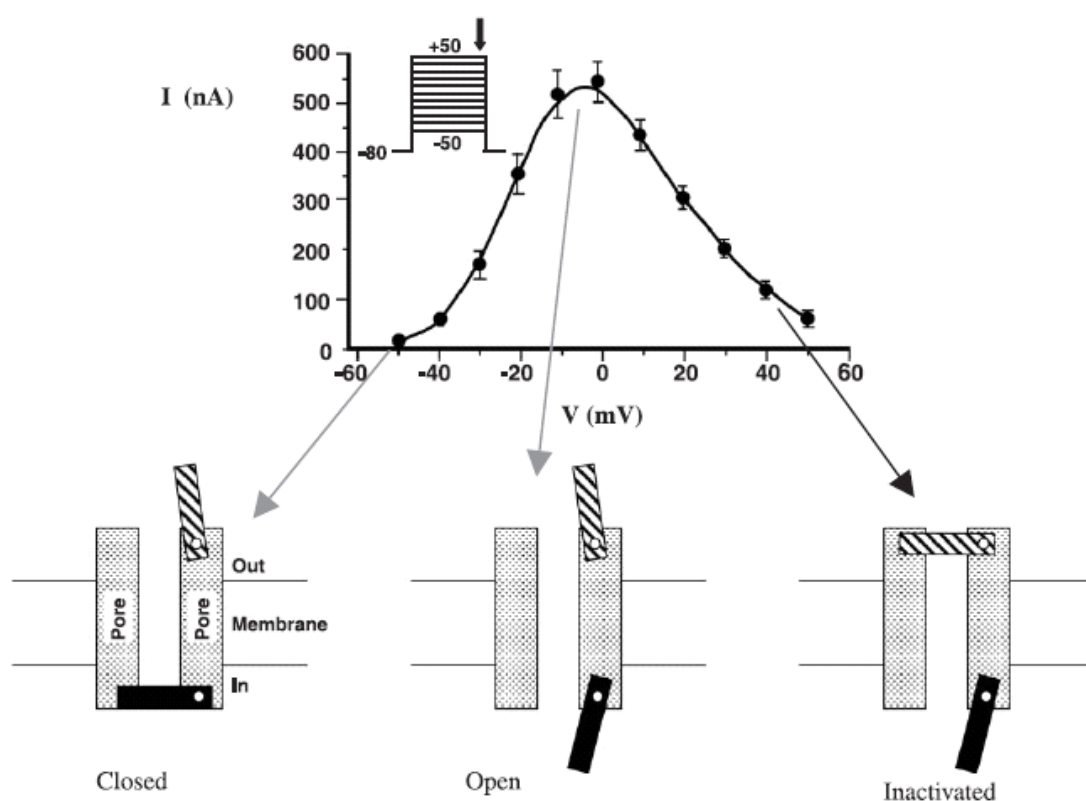
Det finns även andra Kir-kanaler som är viktig för normal funktion av hjärtat men som inte har någon betydande roll vid repolarisering av aktionspotentialen vid normala fysiologiska förhållande. Exempel på sådana Kir-kanaler är K_{ATP} -kanaler som inhiberas av intracellulärt ATP och aktiveras av nukleotid difosfater. K_{ATP} -kanaler utgör en länk mellan cellmetabolismen och membranpotentialen, och fungerar som en skyddsmekanism genom att öppnas vid metabolisk stress (ischemi och hypoxi) och därigenom minska aktionspotentialens varighet och minimera efflux av K^+ (Nerbonne & Kass 2005).

KCNH2-kanalen

Som tidigare nämnt kodar KCNH2-genen för den snabba försenade utåtriktade K^+ -strömmen (I_{Kr}). Upptäckten att KCNH2 kodar för I_{Kr} -kaliumkanalen gjordes genom elektrofysiologiska undersökningar av humana KCNH2-kanaler uttryckta i *Xenopus*-oocyter. Dessa undersökningar visade på att KCNH2 kodar för en K^+ -kanal med biofysiska egenskaper som var nära identiska med I_{Kr} (Sanguinetti et al 1995, Trudeau et al 1995).

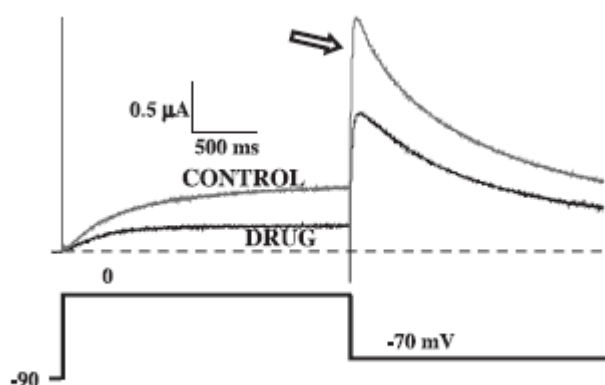
Den först upptäckta subenheten som bildar komplex med KCNH2 var minK (McDonald et al 1997), som tidigare visat sig bilda komplex med KCNQ1 (Barhanin et al 1996, Sanguinetti et al 1996). När minK uttrycks tillsammans med KCNH2 ökas densiteten av I_{Kr} utan nämnvärda effekter på kanalens kinetik (McDonald et al 1997). En annan subenhet som visat sig bilda komplex med KCNH2 är MiRP1 (minK-relaterad peptid 1, kodas av genen KCNE2) (Abbott et al 1999). Vid jämförelse av heterolog expression i *Xenopus*-oocyter av enbart KCNH2 med heterolog expression av KCNH2 tillsammans med MiRP1, visar det senare en större likhet med I_{Kr} -kanaler vad gäller bland annat spänningsberoende och konduktivitet (Abbott et al 1999). Den KCNH2-regulerande funktionen av MiRP1 har visat sig vara viktig eftersom olika genvarianter av KCNE2 har visat sig vara involverade i både medfödda och läkemedelsinducerade former av LQTS (Sesti et al 2000, Splawski et al 2000). Dock är ämnet kontroversiellt huruvida MiRP1 behövs för normal funktion av I_{Kr} . När KCNH2 uttrycks i däggdjursceller (Chinese Hamster Ovary-celler (CHO-celler)) skiljer sig K^+ -kanalens egenskaper mindre från I_{Kr} -kanalen än när KCNH2 uttrycks i *Xenopus*-oocyter, och avvikelser som finns kvar i däggdjurscellerna elimineras inte vid samtidigt expression av MiRP1 (Weerapura et al 2002).

KCNH2-kanalen har en transmembran K^+ -selektiv por med två ”port”-mekanismer (se figur 6). En aktiveringsport och en inaktiveringsport vars öppning och stängning är beroende av membranpotentialen samt tid. För att K^+ -joner ska kunna passera genom kanalen ska båda portarna vara öppna, är en port stängd kan inga K^+ -joner passera. Vid depolarisering av membranet öppnas aktiveringsportarna, kallas aktivering, och vid repolarisering stängs aktiveringsportarna, kallas avaktivering. I motsats till detta stängs inaktiveringsportarna vid depolarisering, kallas inaktivering, medan de öppnas vid repolarisering, benämns återhämtning från inaktivering. Vid vilomembranpotential är alltså aktiveringsporten stängd och inaktiveringsporten öppen. Hade båda portarna reagerat lika fort vid ändring i membranpotentialen hade det aldrig kunnat passera några K^+ -joner genom kanalen. Typiskt responderar inaktiveringsporten snabbare på ändring i membranpotentialen än aktiveringsporten vilket skapar ett tillstånd när båda portarna är öppna och K^+ -joner kan passera genom kanalen (Witchel et al 2002).



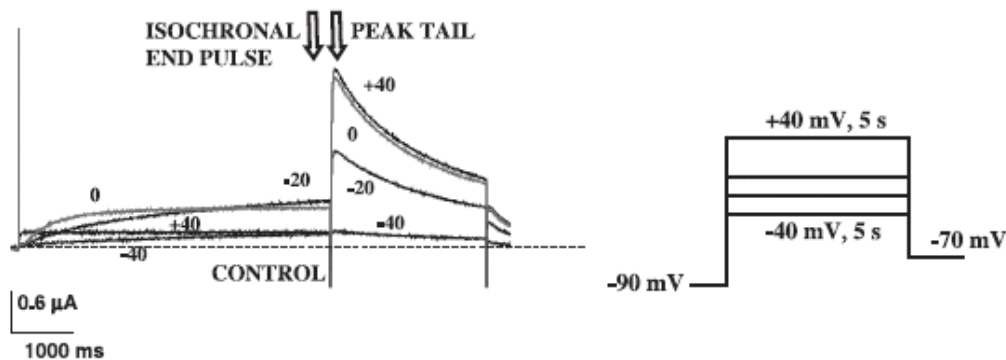
Figur 6: De två ”portarnas” position vid olika relevanta spänningar. Aktiveringsporten, som reagerar långsammare vid spänningsändring, motsvarar den svarta rektangeln och inaktiveringsporten, som reagerar snabbare vid spänningsändring, motsvarar den randiga rektangeln. Den övre delen av figuren visar förhållandet mellan ström och spänning, när det kommandoprotokoll som pilen pekar på används vid elektrofysiologiska mätningar på KCNH2-kanalen (Witchel et al 2002).

När membranet är depolariserat är de flesta KCNH2-kanalerna inaktiverade varpå inga K^+ -joner kan passera genom dem. Vid repolarisering återhämtar sig kanalerna från inaktivering och är öppna en tid innan de avaktiveras eftersom avaktiveringen har en långsammare kinetik. Detta resulterar i att mer ström kan passera genom kanalerna efter depolarisering när den elektrokemiska drivkraften på den utåtriktade K^+ -strömmen börjat avta. Denna ström av K^+ -joner efter depolarisering ("tail"-ström) ger ett utseende karaktäristiskt för KCNH2-kanaler vid elektrofysiologisk mätning (se figur 7) (Witchel et al 2002).



Figur 7: Karaktäristisk ström genom KCNH2-kanalen, med och utan blockerande läkemedel (propafenone), framkallat genom spänningsprotokollet som visas i nedre delen av figuren. Pilen pekar på den karaktäristiska "tail"-strömmen (Witchel et al 2002).

När en cell, t.ex. en *Xenopus* oocyt, med heterologt uttryckta KCNH2-kanaler depolariseras stegvis från vilomembranpotentialen (-80 mV till -70 mV, -80 mV till -60 mV osv), ses den största strömmen (isokron ändström) genom kanalerna vid depolarisering till -20 mV till -10 mV. Detta eftersom samtidigt som depolarisering leder till aktivering och därmed öppning av fler kanaler ses samtidigt en depolariseringsinducerad inaktivering hos allt fler kanaler, vilket resulterar i att inaktiveringen minskar strömmen genom kanalerna vid depolarisering över 0 mV. Samtidigt med att den isokrona ändströmmen minskar ses en ökning av "tail"-strömmen vid repolarisation eftersom kanalerna har återhämtat sig från inaktiveringen och det är färre som har avaktiverats (se figur 8) (Witchel et al 2002).



Figur 8: Ström genom KCNH2-kanalen vid depolarisering till olika steg med repolarisering ned till -70 mV emellan enligt protokoll till höger i figuren (Witchel et al 2002).

K⁺-kanaler i hästens hjärta

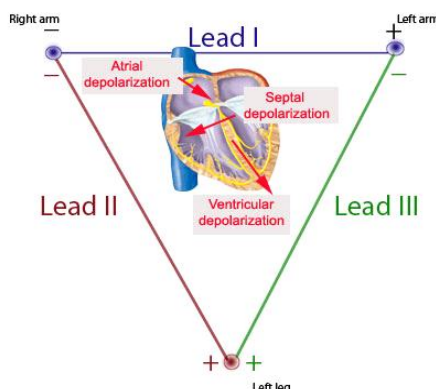
Det finns studieresultat som tyder på att K⁺-strömmarna I_{Kr} och I_{Ks} som bidrar till hjärtats repolarisation finns hos hästar (Finley et al 2002). Även den repolariserande K⁺-strömmen I_{Kur} har påvisats hos häst (Finley et al 2003). Kaliumkanalerna KCNQ1 och KCNH2 har identifierats i hästars atrium samt ventriklarnas endokardium och epikardium i Western blot analyser genom användning av antikroppar mot de humana homologerna. Ytterligare Western blot analyser visade att de accessoriska subenheterna KCNE1 och KCNE3 uttrycks i hästars atrium och ventriklar. mRNA från den accessoriska subenheten KCNE2 har identifierats i hästens myokardium med hjälp av real-time PCR. Resultaten visade också på att KCNE1 associerar med både KCNQ1 och KCNH2 i hästens hjärta, och att KCNE3 inte associerar med KCNH2. Genom elektrofysiologiska undersökningar ("whole cell patch-clamp analysis") på myocyter från ventriklarna kunde det mätas K⁺-strömmar överensstämmande med I_{Ks}. Elektrofysiologiska mätningar på myocyter från ventriklarna med chromanol 293B som antagoniserar I_{Ks} och methanesulfonanilide MK-499 samt cisapride som antagoniserar I_{Kr} gav anledning till förlängt aktionspotential vilket tyder på att både I_{Ks} och I_{Kr} bidrar till aktionspotentialens repolarisation i hästens hjärta.

Dessa resultat tyder på att det molekylära grundlaget för ventriklarnas repolarisation hos hästar liknar det som finns hos människan, och hästar anses därför mottagliga för läkemedelsinducerade arytmier och förvärvat LQTS (Finley et al 2002).

EKG

En hjärtundersökning inkluderar alltid en detaljerad anamnes och en grundlig klinisk undersökning med noggrann auskultation av hjärtat. För att samla ytterligare information om hjärtats funktion kan det utföras andra diagnostiska undersökningar, som biokemi, ekokardiografi och elektrokardiografi (EKG). EKG är det ultimata verktyget för att visualisera hjärtats elektriska aktivitet och kunna diagnosticera arytmier (Verheyen et al 2010a).

För att förstå hur EKG fungerar kan hjärtats muskelceller föreställas fungera som en elektrisk dipol i ett konduktivt medium. När alla kardiomyocyter befinner sig vid vilomembranpotential föreligger ingen elektrisk dipol. Vid spridning av ett aktionspotential över hjärtat uppstår flera olika orienterade dipoler av olika storlek, vilket kan detekteras som en nettoström på kroppsytan. Nettoströmmen betecknas hjärtvektorn. Strömmen mäts mellan två elektroder, en positiv och en negativ. Kombinationen av två elektroder varemellan en potentiell skillnad i ström mäts, kallas en bipolär avledning. Om strömmen är riktad mot den positiva elektroden blir deflektionen på EKG positiv, och är den riktad mot den negativa elektroden så blir den negativ. Normal spridning av ett aktionspotential följer en fastsatt väg genom hjärtat. Deflektionerna på EKG stammar från depolarisation och repolarisation av relativt stora muskelmassor, så som atriernas och ventriklarnas myokardium. Depolarisation av sinusknutan och AV-knutan ger inte tillräckligt stora elektriska förändringar så att det kan visualiseras på EKG (Verheyen et al 2010a). Nedan i figur 9 visas Willem Einthovens triangel. Willem Einthoven, EKG:ets uppfinnare, kombinerade tre elektroder till tre standardiserade avledningar. Elektroderna placerades på vänster och höger arm samt vänster ben. Kombinationen av de olika elektroderna ger anledning till avledning I-III (Cunningham & Klein 2007).



Figur 9: Einthovens triangel (<http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/cardio/ECGbasics.htm> 2012-12-27).

I figur 10 visas utseendet av ett hjärtslag på en EKG-upptagning i avledning I och de olika deflektionernas beteckningar.



Figur 10: Utseendet av ett hjärtslag på EKG i avledning I (Nerbonne & Kass 2005).

P-vågen: Orsakas av depolarisation av atrierna vilket ger en positiv deflektion.

PR-intervallet: Under denna tid sprids impulsen vidare genom AV-knutan till ventriklarna.

Q-vågen: Den första delen i QRS-komplexet som motsvarar ventriklarnas depolarisation. Q-vågen motsvarar spridning av aktionspotentialen från vänster till höger genom *septum interventiculare*. Hjärtvektorn är alltså riktad från vänster mot höger vilket ger en liten negativ deflektion på EKG.

R-vågen: Avspeglar depolarisation av ventriklarna, vilket resulterar i en stor positiv deflektion. Den positiva orienteringen på deflektionen uppstår på grund av att hjärtat är tiltat mot vänster sida i bröstkorgen och att impulsen nått *apex cordis* och nu sprids uppåt i båda ventriklarna (Dyce et al 2007, Cunningham & Klein 2007).

S-vågen: Efter depolarisationen av ventriklarna går R-vågen mot noll och omedelbart herefter uppstår en liten negativ deflektion vars fysikaliska grund inte är helt klarlagd (Cunningham & Klein 2007).

T-vågen: Motsvarar repolarisationen av ventriklarna som inte är lika förutsägbar som deras depolarisation. Repolarisationen kan spridas med riktning antingen inåt eller utåt genom ventriklarnas väggar, och således ge antingen en positiv eller negativ deflektion (Cunningham & Klein 2007).

Det finns inget universellt accepterat avledningssystem hos stora djur. ”The base-apex lead” är en vanlig använd bipolar avledning hos häst där den positiva elektroden placeras på vänster sida av thorax där hjärtslagen palperas starkast, den negativa elektroden placeras dorsalt på höger *spina scapulae* och jordelektroden placeras var som helst en bit ifrån hjärtat (Reef & McGuirk 2009). I denna avledning är P-vågen en positiv deflektion hos de flesta hästar. P-vågen är ofta kluven så att den har två toppar (Verheyen et al 2010a). QRS-komplexet börjar med en liten positiv deflektion vilken åtföljs av en stor negativ deflektion som åtföljs av ST-segmentet. Utseendet på T-vågen är variabel, den kan vara positiv, negativ och bifasisk, ofta varierar dess utseende under en upptagning (Reef & McGuirk 2009).

Vid analys av EKG är det viktigt att ha ett metodiskt tillvägagångssätt så att inte artefakt övertolkas eller viktiga detaljer förbises eller feltolkas. Därför är det viktigt att börja med att bedöma kvalitén och finna eventuella artefakter på det upptagna EKG. Därefter beräknas hjärtfrekvensen, vilket kan göras manuellt genom att till exempel räkna R-vågor över en viss tid, eller automatiskt via en programvara på datorn. Regulariteten på hjärtrytmen bedöms. Små skillnader i RR-intervallen är fysiologiskt men för stora skillnader är abnormt. Om där föreligger irregulariteter i hjärtrytmen avgörs det om dessa är intermittenta eller persisterande, kommer de slumpvis eller i ett visst mönster. Slutligen bedöms morfologi och längden av de olika vågorna, deras kronologiska ordningsföljd samt intervallen mellan dem. De mätta värdena jämförs med referensvärde för den aktuella arten (Patteson 1996). Störningar i hjärtrytmen kallas arytmier och de klassificeras efter deras ursprung från sinusknutan, atrierna, AV-knutan eller ventriklarna (Verheyen et al 2010b).

Långt QT-syndrom (LQTS)

Långt QT-syndrom (LQTS) är en hjärtsjukdom karaktäriserad av synkop, kramper och plötslig hjärtdöd, ofta hos unga individer som i övrigt är friska. Sjukdomen kännetecknas av ett förlängt QT-intervall vid EKG-upptagning, vilket reflekterar försenad repolarisation av ventriklarna (Witchel & Hancox 2000). Kraftig förlängning av QT-intervallet kan vid passande omständigheter verka proarytmiskt och leda till torsade de pointes (Shah 2002). Torsades de pointes (TdP) är en polymorf ventrikeltakykardi som på EKG-upptagning karaktäriseras av att QRS-komplexet roterar runt den isoelektriska linjen (Surawicz 1989). TdP kan ge gå över i ventrikelflimmer och leda till plötslig hjärtdöd (Sanguinetti et al 1995).

QT-intervallet motsvarar depolarisation och repolarisation av ventriklarna. En förlängning av QT-intervallet orsakas av förändringar av de jonkanaler som är involverad i bildningen av ventriklarnas

aktionspotential. En minskning i de repolariserande utåtriktade K^+ -strömmarna eller en ökning i de depolariserande inåtriktade Na^+ - och Ca^{2+} -strömmarna involverade i aktionspotentialens formation, leder till förlängning av QT-intervallet (Witchel & Hancox 2000). När repolarisationen går långsammare kan det uppstå spontana depolariseringar under den fallande delen av platåfasen, vilket kallas tidig-efter-depolarisation (EAD). EAD som inte är synkroniserade med något externt stimuli och som uppstår på grund av reaktivering av L-typ Cav-kanaler och ökad ström genom Na^+/Ca^{2+} -utbytarkanalen, utgör en utlösare för TdP vid LQTS (Hedley et al 2009).

LQTS förekommer i både en kongenital och en förvärvad form (Keating & Sanguinetti 2001). Humant finns över 700 beskrivna mutationer i tolv olika gener (LQT1-12) som ligger bakom den kongenitala formen av LQTS (Hedley et al 2009). Det förekommer mutationer i flera porbildande α -subenheter för Na^+ -, Ca^{2+} och K^+ -kanaler samt i accessoriska subenheter. De mest prevalenta formerna av kongenital LQTS är LQT1 och LQT2 (Hedley et al 2009). LQT1 orsakas av mutation i KCNQ1 och ger en reducerad I_{Ks} medan LQT2 orsakas av mutation i KCNH2 och ger en reducerad I_{Kr} (Wang et al 1996, Curran et al 1995). Kongenital LQTS har inte identifierats hos veterinära patienter (Finley et al 2003). Det finns flera orsaker till den förvärvade formen av LQTS, bland annat hjärtsjukdomar som kardiomyopati och ischemi, bradykardi, störningar i ämnesomsättningen till exempel hypokalemi, samt behandling med vissa läkemedel (Keating & Sanguinetti 2001). Exempelvis behandling med vissa antibiotika, antihistaminer och antiarytmiska läkemedel kan orsaka förvärvat LQTS (Keating & Sanguinetti 2001).

Många läkemedel som associerats med QT-förlängning och samtidig risk för arytmier och plötslig hjärtdöd, har visat sig blockera och/eller förhindra transporten av KCNH2-kanalen till cellmembranet (I_{Kr}). Anledningen till att så strukturellt heterogena läkemedel blockerar just KCNH2-kanaler tros bero på åtminstone två karaktäristiska strukturella drag hos KCNH2-kanalen. Den inre håligheten i KCNH2-kanalen är mycket större än hos andra Kv-kanaler och S6-domänerna hos KCNH2-kanalen har vardera två aromatiska aminosyror (tyrosin och fenylalanin) in mot kanalens inre hålighet (totalt åtta) som kan interagera med stora aromatiska läkemedel. Dessutom binder en del läkemedel bättre när kanalen är inaktiverad (Keating & Sanguinetti 2001, Perry et al 2010). Den potentiella risken för att ett läkemedel blockerar KCNH2-kanalen har lett till att läkemedel testas för detta i tidigt stadiet av läkemedelsutvecklingen (Perry et al 2010). Alla icke-antiarytmiska läkemedel som godkänns i dessa första screeningstudier ska även genomgå en så

kallad grundlig QT-studie där deras potentiella effekt på QT-intervallet undersöks (ICH Topic E14, 2005).

Grundlig QT-studie

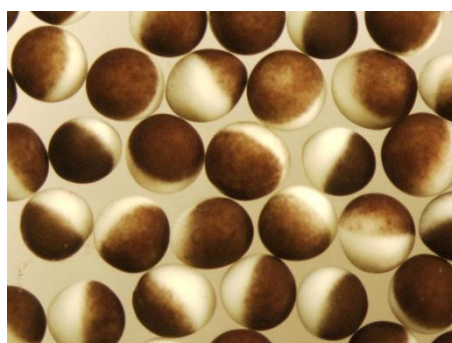
Alla icke-antiarytmiska läkemedel ska genomgå en så kallad grundlig QT/OTc-studie (QT-studie) där deras potentiella effekt på QTc-intervallet hos friska människor undersöks enligt riktlinjer fastställda av "The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use" (ICH) (ICH Topic E14, 2005). QT-intervallet har ett omvänt förhållande till hjärtfrekvensen, dvs. QT-intervallet blir kortare när hjärtfrekvensen stiger. För att kunna jämföra QT-intervall vid två olika tidpunkter hos en individ, samt QT-intervall hos olika individer, så måste QT-intervallet korrigeras för hjärtfrekvensen. Det korrigerade QT-intervallet kallas QTc-intervallet. De två mest använda korrektionsformlerna humant är Fridericia's och Bazett's formel (Stylianou et al 2008). Dessa formler har inte visat sig lika bra till att korrigera QT-intervallet hos häst som den styckvis linjära regressionsmodellen beskriven av Pedersen et al (2013). I en grundlig QT-studie undersöks om ett läkemedel uppnår en tröskeleffekt på hjärtats repolarisation. Tröskelvärde för att ett läkemedel kan godkännas utan ytterligare EKG-undersökningar, ligger på en QTc-förlängning omkring 5 millisekunder. Att läkemedel inte kommer över detta tröskelvärde anses vara en rimlig bekräftelse på att läkemedlet inte kommer utgöra en risk för induktion av TdP (Malik et al 2010). Eftersom läkemedel som ligger under tröskelvärde godkänns utan krav om fler EKG-undersökningar, är det av stor vikt att studien har förmågan att upptäcka även små förändringar på QTc-intervallet. Detta säkras genom användning av en positiv kontroll, som har en känd QTc-förlängande effekt på omkring 5 millisekunder. Även om andra alternativ till positiv kontroll undersökts, till exempel ibutilide (Beasley et al 2005), så är det användning av moxifloxacin som är den mest använda strategin (Malik et al 2010).

Moxifloxacin är ett fluorokinolon antibiotika med brett antimikrobiellt spektrum som har hög biotillgänglighet vid oral giva hos möss, råttor, hundar och människor (Siefert et al 1999) samt snabb distribution till extravaskulär vävnad (Stass & Kubitza 1999a). Moxifloxacin och dess farmakologiskt inaktiva metaboliter elimineras humant dels via urinen och dels via gallan (Stass & Kubitza 1999b). Moxifloxacin är känd för att ge en förlängande effekt på QTc-intervallet (Démolis et al 2000, White et al 2001, Noel et al 2003) och användes som positiv kontroll vid grundliga QT-studier för första gången 2003 (Darpo et al 2006). Moxifloxacin har en koncentrationsberoende effekt på QTc-intervallet. En oral dosering av moxifloxacin på 400 mg till människor ger en QTc-

förlängande effekt där den nedre delen av ett 90 % konfidensintervall ligger över 5 millisekunder (Yan et al 2010), vilket är passande för att vara en positiv kontroll (ICH E14 Questions and answers (R1)) och moxifloxacin har genom upprepad användning blivit till en slags ”gold standard” som positiv kontroll vid grundliga QT-studier (Malik et al 2010). Moxifloxacin har även visat sig vara ett pålitligt ämne som inte gett anledning till TdP eller andra tecken på proarytmika vid EKG-upptagning hos friska deltagare i grundliga QT-studier (Shah 2005).

Heterolog expression

Xenopus laevis är en sydafrikansk groda som hållits i fångenskap och använts för forskningssyften i många år. Oocyterna från *X. laevis* (se figur 11) är utmärkta att använda för forskningsändamål eftersom de har förmågan att effektivt uttrycka exogent mRNA till proteiner (Wagner et al 2000). pXOOM är plasmidvektorer designade för att kunna fungera som template för expression i däggdjursceller och i *Xenopus*-oocyter (Jespersen et al 2002). Genom att inkorporera en viss gen i pXOOM vektorer, kan den bli uttryckt heterologt i *Xenopus*-oocyter. Oocyternas stora diameter på 1,1-1,3 mm gör dem lätta att hantera. Under naturliga förhållande deponeras *Xenopus*-oocyterna i ogynnsam miljö varför de är tåliga och utrustade med alla substrat nödvändiga för att kunna växa och effektivt uttrycka proteiner. Eftersom de inte är beroende av att kunna uppta substrat från miljön uttrycker de enbart ett litet antal endogena membrantransportsystem vilket endast ger liten bakgrundsstörning vid mätning av exogent uttryckta proteiner. En nackdel med oocyterna är att de mår bäst vid lägre temperaturer och därför är det bäst att arbeta med dem i rumstemperatur runt 19-20°C. Detta kan påverka funktionen av de proteiner som undersöks eftersom de normalt ska fungera vid kroppstemperatur. Vid elektrofysiologisk mätning på jonkanaler uttryckta i *Xenopus*-oocyter används oftast ”The two electrode voltage clamp”-tekniken (TEVC) (Wagner et al 2000).



Figur 11: Oocyter från *Xenopus laevis*.

Syfte

Syftet med denna studie var att undersöka om det går att inducera och påvisa en förlängning av QTc-intervallet hos hästar genom användning av moxifloxacin, ett läkemedel som ger en liten men väl karakteriserad förlängning av QTc-intervallet humant. Studien var uppdelad i två delar, en laboratedel och ett kliniskt försök. Laboratedelen gick ut på att undersöka om moxifloxacin blockerar hästens KCNH2-kanaler heterologt uttryckta i *Xenopus*-oocyter. I den kliniska studien behandlades hästar med moxifloxacin samtidigt med att det blev upptaget EKG som senare blev analyserat.

Metod

Heterolog expression av hästens KCNH2-kanal och elektrofysiologi

Hästens KCNH2-kanal som tidigare har blivit klonad och sekvenserad i det genteknologiska laboratoriet på fysiologiavdelningen tillhörande Institutet for Klinisk Veterinær- og Husdyrvidenskab (NCBI referens sekvens: NM_001193658.1), fanns tillgänglig inkorporerad i en pXOOM U vektor (bakterieplasmid).

Uppformering av DNA med Maxi-kit

Som utgångspunkt användes *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterier innehållande hästens KCNH2-gen i pXOOM U vektor, som förvarades i -80°C. QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) användes enligt tillverkarnas instruktion till uppformering och utrensning av plasmiden från *E. coli* bakterierna. *E. coli*-bakterierna uppformerades i standard LB medium. Utrensningen av plasmiden från bakterierna baserades på en modifierad alkalisk lysering av bakteriecellerna åtföljt av bindning av DNA plasmiderna till ett speciellt framtaget filter, ”QIAGEN anion-exchange resin”, under passande salt- (lågt) och pH-förhållande. RNA, proteiner, färgämnen samt lågmolekylära föroreningar sköljdes bort med ett anpassat saltmedium. DNA plasmiderna eluerades i en buffert med hög salthalt med efterföljande uppkoncentrering och avsaltning genom utfällning av DNA vid tillsatts isopropanol. DNA plasmiderna löstes därefter upp i Tris·Cl buffert (med pH 8 och koncentration 10 mM). Gelelektrofores användes till kontroll av hela processen. Koncentrationen av DNA mättes genom spektrofotometri i en NanoDropTM 3300 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Gelelektrofores till visualisering av DNA och mRNA

Gelelektrofores användes till att visualisera DNA och mRNA. Proverna blandades med en 3:1 laddningsbuffert gjord utav Gel Loading Dye, Blue (6X) (New England Biolabs[®] inc) och kördes på en 1 % agarosegel (CertifiedTM Molecular Biology Agarose (Bio-Rad[®])) innehållande etidiumbromid, i en TBE buffert. För att kunna avgöra storkelen på DNA laddades brunnarna bredvid proverna med 1 kb DNA ladder (New England Biolabs[®] inc). Elektroforesen kördes i 20-30 minuter vid 80 mA. Banden på gelen visualiserades följaktligen genom UV-ljus med hjälp av en UVP MultiDoc-It Digital Imaging System (AH Diagnostics).

Skärning av DNA plasmiderna

För att DNA plasmiderna ska kunna användas som template till in vitro transkription måste det vara linjärt, det vill säga de cirkulära plasmiderna måste ”klippas upp” med hjälp av ett

restriktionsenzym. Restriktionsenzym känner ofta igen korta specifika sekvenser som är palindrom, t.ex. 5'TCTAGA3' för restriktionsenzymet Xba I. DNA-sekvensen på den använda vektorn pXOOM U är känd och passande restriktionsenzym med känt uppklipningsställe som inte finns i KCNH2-genen kunde användas. Två lämpliga restriktionsenzym, Not I (New England BioLabs[®] inc) och Xba I (New England BioLabs[®] inc) användes i två olika reaktioner. Restriktionsenzym tillförs DNA plasmid-lösningen med en specifik buffert som ger optimala villkor för enzymet. Skärningen avslutades genom tillförsel av proteinas K (New England BioLabs[®] inc), som bryter ner restriktionsenzymet.

Upprensning av DNA

High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) användes enligt tillverkarens instruktion till upprepning av DNA. DNA binder till specifikt till ytan av glasfibrer i närvaro av kaotrop salter som denaturerar makromolekyler så som proteiner och nukleinsyror. Proteiner och andra föroreningar tas bort genom sköljning av filtret. DNA elueras i en buffert med låg salthalt. Gelelektrofores användes till att kontrollera att DNA blivit uppklippt som beskrivet ovan. Koncentrationen av det uppklippta DNA mättes genom spektrofotometri i en NanoDrop[™] 3300 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

In vitro transkription

mMESSAGE mMACHINE[®] T7 kit (Ambion[®]) användes enligt tillverkarnas instruktion till att framställa mRNA in vitro med de uppklippta DNA plasmiderna som template. pXOOM U vektorn innehåller de startsekvenser som transkriptionsenzymerna i T7 kittet innehåller (Jespersen et al 2002). Till upprepning av in vitro transkriptionsprodukten användes ett MEGAclean[™] kit (Ambion[®]) enligt tillverkarnas instruktion. MEGAclean[™] kittet separerar effektivt mRNA från överblivna nukleotider, enzymer och buffertkomponenter genom ett RNA-bindande filter, sköljning och därefter eluering av mRNA. Gelelektrofores användes till att kontroll av mRNA som beskrivet ovan. Koncentrationen mättes genom spektrofotometri i en NanoDrop[™] 3300 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Det framställda mRNA förvarades därefter vid -80°C fram till injektion i *Xenopus*-oocyter.

***Xenopus*-oocyter**

Xenopus-oocyter erhöles dels färdiga till injektion av mRNA från EcoCyt Bioscience (Tyskland) och kom dels från grodor som tillhör det genteknologiska laboratoriet på fysiologiavdelningen tillhörande Institutet for Klinisk Veterinär- og Husdyrvidenskab. Oocyterna opereras ut från

hongrodornas ovarier genom ett cirka 1 cm långt abdominalt snitt när hongrodorna är under anestesi i 15-20 minuter med 2 g/l Tricain (Sigma-Aldrich®). Follikellagret runt oocyterna tas bort dels mekaniskt med en pincett och dels genom en timme lång enzymatisk behandling med Worthington Collagenase Type1(Medinova®) och 0,1 % trypsin inhibitor T-2011 (Sigma®) i kulorimedium (90mM NaCl, 1mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 5mM Hepes, pH 7,4). Detta efterföljs av att oocyterna sköljs fem gånger med kulorimedium innehållande 0,1 % A-6003 BSA (Sigma®) och därefter inkuberas oocyterna en timme i en hyperton fosfatbuffer (100 mM K₂HPO₄, pH 6,5). Följaktligen väljs oocyter i stadium V och VI ut, sköljs fem gånger med kulorimedium och inkuberas över natten i 19°C. Oocyterna är sedan färdiga för injektion (Grunnet et al 2001).

Injektion av mRNA i *Xenopus*-oocyter

Oocyterna injicerades med 50 nl mRNA (235,5 ng/μl) med hjälp av en Nanoject microinjector (Drummond ScientificR). Kontroll-oocyter injicerades med 50 nl elueringslösning från MEGAclean™ kittet (Ambion®) som användes vid upprepningen av mRNA. Oocyterna inkuberas i kulorimedium (90mM NaCl, 1mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 5mM Hepes, pH 7,4) vid 19°C i tre dagar innan elektrofysiologiska undersökningar. Borttagande av döda oocyter och byte av kulorimedium skedde dagligen.

Elektrofysiologi

TEVC användes till att göra elektrofysiologiska mätningar. TEVC är en teknik som används till att hålla ett membranpotential vid ett konstant värde samtidigt som strömmen som flödar över membranet kan mätas. Strömmen som flödar över membranet vid en viss spänning kan mätas och den utgörs dels av ström som flödar genom öppna jonkanaler och dels av en kapacitansström. Kapacitansström föreligger endast vid ändring av membranpotentialen. Vid konstant membranpotential motsvarar den totala strömmen över membranet rörelsen av joner genom öppna jonkanaler. Principen bakom TEVC är att injicera en ström med samma amplitud men med motsatt tecken som den ström som flödar över membranet vid ett visst membranpotential för att hålla membranpotentialen konstant, eftersom där då inte föreligger någon nettoström över membranet. Genom att mäta strömmen som behövs injiceras för att hålla membranpotentialen konstant, mäts samtidigt strömmen som flödar över hela cellmembranet. Två mikroelektroder kopplade till en förstärkare, införs i cellen, den ena mäter membranpotentialen och den andra injicerar ström (Ashcroft 2000).

Mikroelektroder gjordes av TW 120F-3 borosilicate capillary glas i en P97 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instruments). Mikroelektroderna var fyllda med 2 M KCl och hade en resistens mellan 1,5-2,0 M Ω . Elektroderna anslöts till en förstärkare, OC-752 B Oocyte Clamp (Warner Instruments), och data insamlades via Axon Digidata 1440A Data Acquisition System (Axon CNS Molecular Devices). Programvaran pClamp[®] v.10.2.14 användes till att insamla och spara data på en PC, samt designa och köra protokollet.

Ett tre-stegsprotokoll användes till de elektrofysiologiska mätningarna. Oocyterna hölls vid ett ”vilo”-membranpotential på -80 mV, depolariserades till -10 mV i 2 sekunder med efterföljande repolarisering tillbaka till -80 mV för att kunna mäta på KCNH2-kanalernas ”tail”-ström. Protokollet varade i 6,2 sekunder. Oocyterna som användes till de elektrofysiologiska mätningarna hade ett stabilt membranpotential runt -50 mV till -70 mV. Mätningarna gjordes under konstant flöde av kulori/kulori-moxifloxacin vid en rumstemperatur på 19-20°C.

Kulori användes som kontroll. Det gjordes en stamlösning av moxifloxacin (Moxifloxacin hydroklorid, Sigma-Aldrich[®]) på 1 mM i kulori med efterföljande förtunning till 500 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M och 5 μ M omedelbart innan de elektrofysiologiska mätningarna. Terfenadine som blockerar den humana KCNH2-kanalen i *Xenopus*-oocyter (Roy et al 1996, Suessbrich et al 1996) och som visat sig blockera även hästens KCNH2-kanal (10 μ M inhiberar mellan 90-100% av ”tail”-strömmen) vid undersökningar i det genteknologiska laboratoriet på fysiologiavdelningen tillhörande Institutet for Klinisk Veterinær- og Husdyrvidenskab (opublicerad data från Emma Olanders *Masters thesis* 2012), användes som kontroll av försökets uppsättning.

De elektrofysiologiska mätningarna började med ett konstant flöde av kulori följt av stigande koncentration av moxifloxacin (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M och 1 mM). Protokollet kördes tills strömmen stabiliserades vid varje koncentration av moxifloxacin. Den stabiliserade ”tail”-strömmen användes till beräkningarna. Förhållandet mellan ”tail”-strömmen vid moxifloxacin och ”tail”-strömmen vid kontroll ($I_{\text{mox}}/I_{\text{kontroll}}$) användes till att beräkna dos-responsförhållandet. Koncentrationen transformerades till log(koncentration) och plottades mot % inhibering av kontrollens ”tail”-ström med hjälp av Graph Pad Prism (GraphPad Software, Inc. USA). De icke transformerade värdena av koncentrationen markerades på X-axeln. Data presenteras som medelvärde $\pm$ standardfel (SEM). Variansanalys (ANOVA) (Bonferroni’s multiple comparsion test) användes till att undersöka om där var signifikant skillnad på genomsnittet av

ströminhiberingen vid de olika koncentrationerna av moxifloxacin i Graph Pad Prism (GraphPad Software, Inc. USA).

Klinisk moxifloxacinstudie på häst

Detta var en tvärsnittsstudie som var randomiserad, blind, placebokontrollerad, engångsdosering och två periodsindeldad. De använda försökshästarna tillhör Institutet for Produktionsdyr og Heste, Köpenhamns universitet. Studien var godkänd av Dyreforsøgstilsynet i enlighet med dansk laggivning samt den lokala etiska kommittén på Institutet for Produktionsdyr og Heste, Köpenhamns universitet.

Försökshästar

Fyra hästar fanns till rådighet till studien. Samtliga var ston med en ålder på mellan 6-14 år. De var vid god hälsa vid försöket, vilket försäkrades av ansvarig djurskötare och genom en allmän klinisk undersökning omedelbart innan försöksstarten båda dagarna. Hästarna stod i sitt vanliga stall, fodrades som de brukar och genomgick vardagliga rutiner under hela tiden som studien pågick, bortsett från att de inte var ute i hagen på morgonen de två behandlingsdagarna. Hästarna var fodrade på morgonen och hade hösilage i boxen vid försöksstarten. De fick sedan en giva hösilage någon gång mitt på dagen. Hästarna genomgick studien samtidigt och kördes parallellt, tidsmässigt förskjutna i förhållande till varandra de båda behandlingsdagarna. På första behandlingsdagen fick hästarna ilagt en perifer venkateter (PVK) i *vena jugularis dexter* för att kunna ta ut blodprov. Hästarnas PVK kontrollerades dagligen mellan behandlingsdagarna och togs ut vid behov (om hästarna var svullna, varma eller ömma vid katetrarna eller katetrarna inte fungerade). Bara en häst hade kvar sin PVK från första behandlingsdagen vid andra behandlingsdagen, de andra tre fick ilagt en ny PVK. Studien varade i totalt nio dagar, med behandling på dag 1 och 7, daglig uppföljning mellan behandlingsdagarna samt två dagars uppföljning efter sista behandlingsdagen. Uppföljningen bestod av observation för eventuella biverkningar och en allmän klinisk undersökning.

Behandling

Hästarna genomgick randomiserat behandling med både placebo och moxifloxacin (Avelox[®] 400 mg; Bayer Schering Pharma AG) med en period på sex dagar för utrensning emellan.

Utrensningsperioden mellan behandlingarna skulle önskvärt ha varit sju dagar, vilket motsvarar fem halveringstider ($T_{1/2} = 33,98$ timmar, Gardner et al 2004), men av praktiska skäl var det bara möjligt att ha sex dagar. På de båda behandlingsdagarna var det vardera två hästar som blev behandlade

med moxifloxacin. Moxifloxacin (Avelox[®] 400 mg; Bayer Schering Pharma AG) doserades enligt 5,8 mg/kg kroppsvikt. Moxifloxacin-tabletterna krossades och löstes upp i cirka 0,5 liter vatten och administrerades med nässvalgsond som efterföljande sköljdes 3-4 gånger med cirka 250 ml vatten för att säkra att hästarna fått i sig hela dosen. Placebobehandlingen bestod i att få ilagt en nässvalgsond och få administrerat 3-4 givor med cirka 250 ml vatten.

Blodprov

Det uttogs blodprov omedelbart innan behandling (nollprov) och vid 0,5, 1, 2, 3, 4 och 5 timmar efter behandlingen för att bestämma koncentrationen av moxifloxacin i blodplasman. Blodprov uttogs både vid placebo- och moxifloxacinbehandlingen. Cirka 4-5 ml blod uttogs i heparinrör vid varje blodprovstagning. Blodproven analyserades med hjälp av ”reverse-phase high-performance liquid chromatography” (HPLC) med fluorescens detektion på Institutet for Veterinær Sygdomsbiologi/Biomedicin, Köpenhamns universitet.

EKG-upptagning och analysering

EKG-upptagning skedde med veterinär digital telemetrisk EKG-utrustning (Televet 100, Roesch & Associates Information Engineering GmbH, Frankfurt am Main, Germany). EKG-utrustningen sattes på enligt protokoll (se bilaga I) så att avledning II liknar den ”base-apex” avledning som ofta används hos häst (Reef & McGuirk 2009) och upptogs löpande i cirka sju timmar under försöksdagarna. För att veta när behandlingen skedde, avbröts upptagningen få sekunder för att få en ny fil. Analys av EKG som skedde blint blev gjort i EKG-upptagningarnas avledning II, och gjordes vid tre tidpunkter (-1.0; -0.5 och 0 timmar) innan behandling (så kallad ”baseline”) och tio tidpunkter (0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5 och 5 timmar) efter behandling. Vid varje tidpunkt mättes fem efterföljande QT-intervall manuellt med hjälp av Cardio Calipers 3.3 (ICONICO, New York, NY, USA) i Televet 100 Version 4.2.0. (Roesch & Associates Information Engineering GmbH, Frankfurt am Main, Germany) enligt fastsatt protokoll (se bilaga II). QT-intervallen mättes från Q-vågens början till T-vågens slut. T-vågens slut bestämdes visuellt som den punkt där T-vågen nådde den isoelektriska linjen. Vid varje tidpunkt mättes hjärtfrekvensen som ett genomsnitt av tio efterföljande hjärtslag och gjordes om till ett beräknat RR-intervall ($RR=60/\text{hjärtfrekvens}$). QT-intervallet blev korrigerat för hjärtfrekvens till QTc enligt den styckvis linjära regressionsmodell som visat sig överensstämma bra vid analys av hästars QT-intervall (Pedersen et al 2013). QTc för ett normalt travsto är 0,452 sekunder vid en puls på 60 ($RR=1$). Detta utnyttjas till att beräkna QTc för försökshästarna utifrån formeln $QT_{c60}=0,4516178+(QT-QT_{\text{standard}})$ där QT är

det uppmätta QT-intervallet i sekunder och QT_{standard} är referensvärdet på QT-intervallet vid samma RR-intervall som QT är mätt (Pedersen et al 2013). Genomsnittet av de tre mätningarna innan behandling, fungerade som så kallat "baseline" QTc-värde. Detta värde subtraherades från de efterföljande "i behandling"-mätningarna, för att etablera ΔQTc som är QTc korrigerat för "baseline". För varje tidpunkt efter behandling jämfördes ΔQTc vid behandling med tidmatchat ΔQTc vid placebo. Analysparametern var ΔQTc vid behandling minus ΔQTc vid placebo vid korresponderande tidpunkter ($\Delta \Delta QTc$) (Malik et al 2009).

Statistik

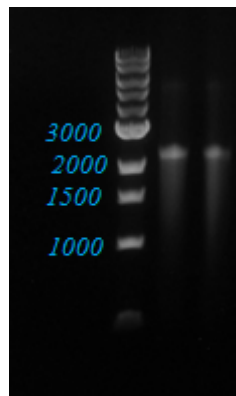
Effekterna på QTc av behandling, behandlingsperiod, tid, baseline, interaktioner mellan behandling och tid, interaktioner mellan behandlingsperiod och tid samt interaktioner mellan behandling och baseline, analyserades med ANCOVA i SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). QTc för varje tidpunkt blev inkluderat som en kovariabel.

Standardavvikelse (SD) och 95 % konfidensintervall blev beräknat för hästarnas genomsnittliga $\Delta \Delta QTc$ vid varje tidpunkt. Standardavvikelse blev även beräknat för hästarnas genomsnittliga QTc-värde vid moxifloxacinbehandling och placebobehandling. $\Delta \Delta QTc$ plottades mot tid i Graph Pad Prism (GraphPad Software, Inc. USA). Även QTc för moxifloxacinbehandling och placebobehandling plottades mot tid i Graph Pad Prism (GraphPad Software, Inc. USA). Data presenteras som medelvärde $\pm$ SEM.

Resultat

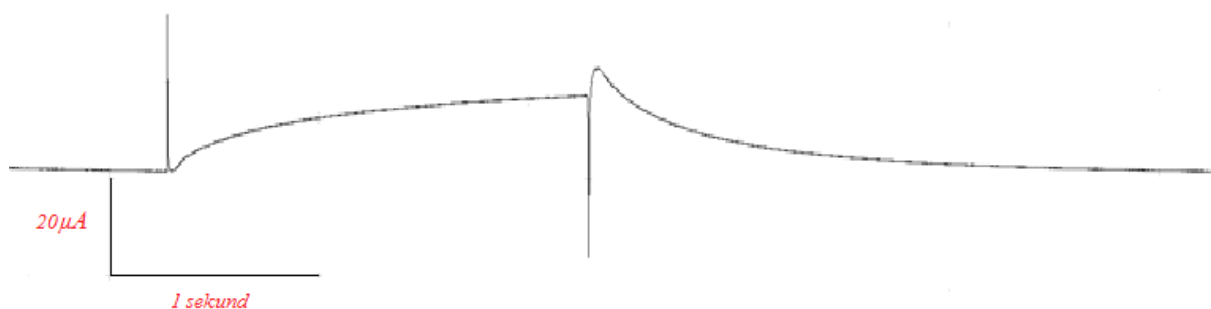
Heterolog expression av hästens KCNH2-kanal och elektrofysiologi

Uppformering av DNA och in vitro transkription av mRNA var lyckat och i figur 12 nedan ses en bild från gelelektrofores med slutprodukten från in vitro transkriptionen. I figuren ses band av KCNH2 mRNA i en av erfarenhet förväntad storleksordning på RNA från hästens KCNH2-gen som motsvarar cirka 2500 baspar jämfört med 1 kb DNA laddern. Det ska observeras att laddern som använts består av DNA, som rör sig långsammare i gelen än RNA, vilket innebär att storleken på DNA inte motsvarar storleken på RNA.



Figur 12: Gelelektroforesbild på in vitro transkriptions produkt. I bana 1 finns 1 kb DNA ladder (New Englands Biolabs[®] inc), numren vid sidan av laddern indikerar storlek i bp. I bana 2 och 3 finns mRNA från in vitro transkriptionen, i en storlek som motsvarande cirka 2500 bp av DNA. Det ska observeras att det är använt en DNA ladder (DNA rör sig långsammare i gelen än RNA).

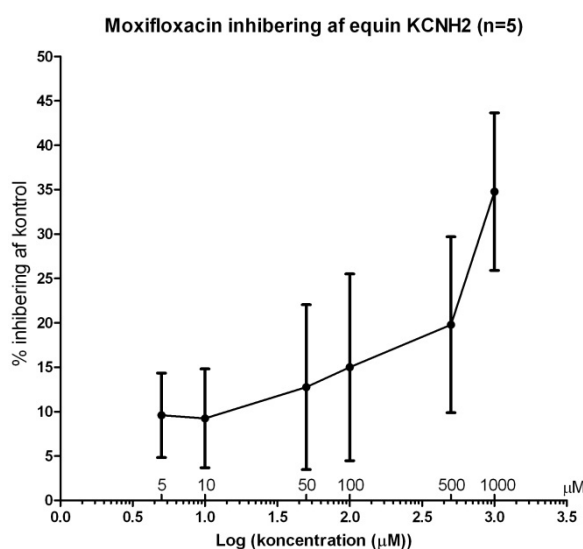
Heterolog expression av hästens KCNH2 i *Xenopus*-oocyterna lyckades vilket konfirmerades genom att den uppmätta strömmen över oocyternas membran vid TEVC (se figur 13) liknar den ström som är karaktäristisk för KCNH2 (se figur 7). Där observerades inga endogena KCNH2-liknande strömmar i kontrolloocyterna.



Figur 13: Strömspår från *Xenopus*-oocyt med hästens KCNH2-kanal heterologt uttryckt, vid depolarisation till -10 mV och efterföljande repolarisation till -80 mV.

Uppsättningen av de elektrofysiologiska mätningarna på *Xenopus*-oocyterna bestyrktes genom mätning av effekten av terfenadine på "tail"-strömmen. Som förväntat gav 10 μ M terfenadine en inhibering på 96,5 % av efterströmmen i jämförelse med kontrollkutori, vilket var i överensstämmelse med tidigare undersökningar i det genteknologiska laboratoriet på fysiologiavdelningen tillhörande Institutet for Klinisk Veterinær- og Husdyrvidenskab samt vad som ses på humana KCNH2-kanaler (Roy et al 1996, Suessbrich et al 1996, opublicerad data från Emma Olanders *Masters thesis* 2012).

Moxifloxacin hade en viss inhiberande effekt på "tail"-strömmen vilket kan ses i figur 14.



Figur 14: Dos-responsförhållande för effekten av olika koncentrationer av moxifloxacin på "tail"-strömmen genom hästens KCNH2-kanaler. I grafen visas genomsnitt $\pm$ SEM för 5 oocyter.

Den genomsnittliga inhiberingen av "tail"-strömmen och standardavvikelsen för de olika koncentrationerna kan ses i tabell 1.

Tabell 1: Den genomsnittliga inhiberingen av "tail"-strömmen $\pm$ SD för de olika moxifloxacin-koncentrationerna.

Koncentration av moxifloxacin (μ M)	Medelvärde $\pm$ SD (%)
5	9,59 $\pm$ 10,6
10	9,24 $\pm$ 12,4
50	12,76 $\pm$ 20,7
100	15,00 $\pm$ 23,5
500	19,78 $\pm$ 22,2
1000	34,77 $\pm$ 19,8

Den genomsnittliga inhibitionen vid den högsta koncentrationen av moxifloxacin (1 mM) var 34,8 ($\pm$ 19,8) %. Den stora spridningen av inhiberingsprocenten samt det låga antalet oocyter som ingick i studien gjorde att det inte observerades någon signifikant inhibering vid någon av de olika moxifloxacin-koncentrationerna. Inte heller var där någon signifikant skillnad i inhibering mellan de olika koncentrationerna. Trots att det inte observerades någon signifikant inhibering av "tail"-strömmen vid någon koncentration observerades det en tydlig tendens till att moxifloxacin inhiberar strömmen genom hästens KCNH2-kanaler.

Klinisk moxifloxacinstudie på häst

Totalt tre hästar ingick i studien då en häst fått uteslutas från studien eftersom EKG-upptagelsen efter att hästen behandlats inte sparades på minneskortet på grund av problem med EKG-upptagaren. Information om hästarna ses i tabell 2 nedan. Det observerades inga biverkningar, så som nedsatt allmänbefinnande, nedsatt aptit, diarré eller koliksymtom, under studieperioden.

Tabell 2: Information om de tre försökshästarna.

Parameter	Värde
Ålder, medelvärde $\pm$ SD, år	10 $\pm$ 4,0
Kön	3/3 ston
Vikt, medelvärde $\pm$ SD, kg	559,3 $\pm$ 69,3
Ras	Två korsningshästar och ett danskt varmblood.
Träningsgrad (alla tre hästarna)	Otränade

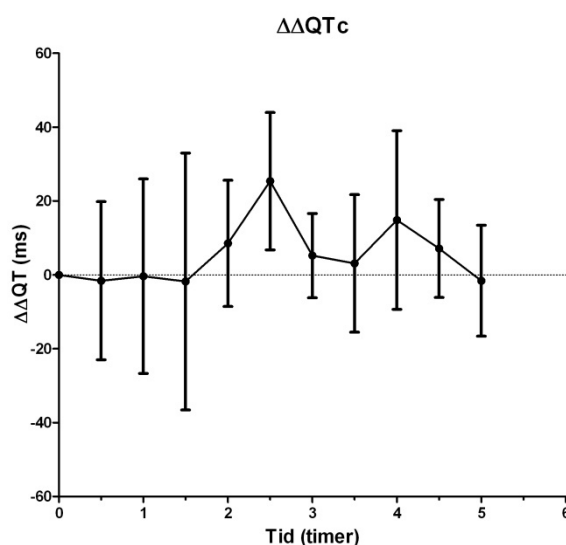
I ANCOVA analysen observerades signifikant effekt på QTc av behandling, "baseline" samt dessa två variabler i kombination. Detta innebär att de QTc-värdena som man får vid moxifloxacinbehandling och placebo-behandling är beroende av respektive "baseline" QTc. Detta

poängterar att det är viktigt att man korregerar för ”baseline” innan QTc-värdena för de olika behandlingarna jämförs.

Den potentiella effekten av moxifloxacin på hjärtats repolarisation mättes som förändring i QTc vid moxifloxacinbehandling korregerat för ”baseline” och tidmatchad placebo ($\Delta\Delta\text{QTc}$). Alla tidmatchade värden på de tre hästarnas genomsnittliga $\Delta\Delta\text{QTc} \pm$ standardavvikelse och deras 95 % konfidensintervall kan ses i tabell 3. Det var stor spridning på data vilket kan ses i tabell 3 och det kunde inte påvisas någon signifikant förlängning av $\Delta\Delta\text{QTc}$ vid någon tidpunkt. Trots att det inte föreligger något signifikant resultat observerades det en tendens till att QT-intervallet blev förlängt vid moxifloxacinbehandling. Detta kan ses på grafen i figur 15.

Tabell 3: Genomsnittliga $\Delta\Delta\text{QTc}$ -värden $\pm$ SD för de tre försökshästar och 95 % konfidensintervall.

Tidpunkt (timmar)	Moxifloxacin	
	Medelvärde $\pm$ SD $\Delta\Delta\text{QTc}$ (ms)	95 % CI
0,5	-1,57 $\pm$ 37,1	(-93,67-90,54)
1	-0,34 $\pm$ 45,6	(-113,62-112,93)
1,5	-1,78 $\pm$ 60,2	(-151,37-147,82)
2	8,54 $\pm$ 29,6	(-64,91-81,99)
2,5	25,38 $\pm$ 32,2	(-54,72-105,48)
3	5,23 $\pm$ 19,8	(-43,90-54,36)
3,5	3,12 $\pm$ 32,3	(-77,02-83,26)
4	14,87 $\pm$ 41,9	(-89,13-118,86)
4,5	7,16 $\pm$ 23,0	(-49,93-64,25)
5	-1,57 $\pm$ 26,1	(-66,29-63,15)

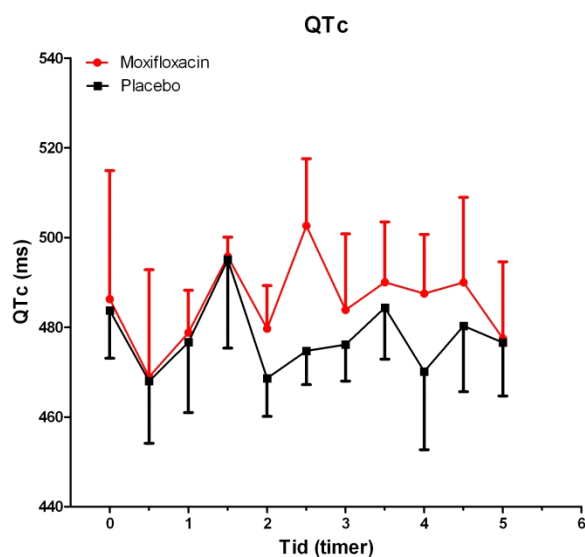


Figur 15: Genomsnittligt $\Delta\Delta QT_c \pm SEM$ över tid efter behandling med moxifloxacin/placebo.

Eftersom baseline har signifikant effekt enligt ANCOVA-analys bör man inte jämföra QTc för moxifloxacin och placebo. Men då skillnaden på ”baseline”-medelvärde är litet för placebo och moxifloxacin (se tabell 4 och figur 16) är det intressant att titta på graferna i alla fall. På graferna (figur 16) ses att genomsnitts QTc följs åt väldigt tätt de första 90 minuterna, för att sedan bli längre för moxifloxacinbehandlingen. Motsvarande effekt ses på grafen i figur 15 där de genomsnittliga $\Delta\Delta QT_c$ -värdena ligger kring 0 de första 90 minuterna för att sedan bli positiva.

Tabell 4: Genomsnittliga QTc-värden $\pm SD$ vid moxifloxacinbehandling respektive placebobehandling.

Tidpunkt (timmar)	Medelvärde $\pm SD$ QTc (ms)	
	Moxifloxacin	Placebo
0	486,3 $\pm$ 49,6	483,8 $\pm$ 18,5
0,5	469,0 $\pm$ 41,4	468,0 $\pm$ 24,1
1	478,8 $\pm$ 16,4	476,7 $\pm$ 27,1
1,5	495,8 $\pm$ 7,5	495,0 $\pm$ 34,1
2	479,7 $\pm$ 16,7	468,6 $\pm$ 14,7
2,5	502,6 $\pm$ 25,9	474,7 $\pm$ 13,1
3	483,9 $\pm$ 29,4	476,1 $\pm$ 14,1
3,5	490,0 $\pm$ 23,3	484,4 $\pm$ 19,9
4	487,5 $\pm$ 22,8	470,1 $\pm$ 30,2
4,5	490,0 $\pm$ 32,9	480,3 $\pm$ 25,5
5	477,5 $\pm$ 29,6	476,6 $\pm$ 20,6

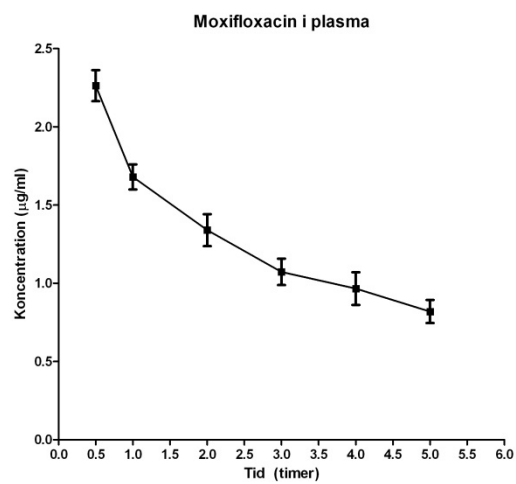


Figur 16: Genomsnittligt QTc $\pm$ SEM över tid efter behandling med placebo respektive moxifloxacin.

Blodproven analyserades med HPLC och i tabell 5 visas genomsnittskoncentrationen av moxifloxacin i plasma $\pm$ standardavvikelsen för de tre hästarna. I grafen i figur 17 visas genomsnittskoncentrationen av moxifloxacin i plasma $\pm$ standardfel för de tre hästarna. Det observerades en snabb absorption av moxifloxacin hos samtliga hästar, med högsta koncentrationen vid första blodprovet 30 minuter efter behandling. Hos de två hästar som behandlats med moxifloxacin den första behandlingsdagen kunde det inte detekteras någon moxifloxacin i nollprovet den andra behandlingsdagen.

Tabell 5: Genomsnittlig plasmakoncentration av moxifloxacin $\pm$ SD vid de olika tidpunkterna.

Tidpunkt (timmar)	Medelvärde $\pm$ SD (μ g/ml)
0	0
0,50	2,26 $\pm$ 0,17
1	1,68 $\pm$ 0,14
2	1,34 $\pm$ 0,18
3	1,07 $\pm$ 0,15
4	0,97 $\pm$ 0,18
5	0,82 $\pm$ 0,13



Figur 17: Genomsnittlig plasmakoncentration av moxifloxacin $\pm$ SEM (μ g/ml) hos de tre hästarna.

Diskussion

Detta examensarbete har undersökt om det går att inducera och påvisa förvärvat LQTS hos häst med moxifloxacin. Eftersom det till författarens kännedom inte finns några studier gjorda på häst där läkemedelsinducerad förlängning av QTc-intervallet undersökts, valdes det att undersöka effekten av moxifloxacin. Detta eftersom man vet att moxifloxacin blockerar den humana KCNH2-kanalen (Bischoff et al 2000, Kang et al 2001, Chen et al 2005, Alexandrou et al 2006) vars motsvarighet finns hos häst (Finley et al 2002), samt att moxifloxacin ger en liten men väl karaktäriserad förlängning av QT-intervallet humant (Démolis et al 2000, White et al 2001, Noel et al 2003). Det var även ett försök att etablera en positiv kontroll till studier på häst liknande grundliga QT-studier humant.

Heterolog expression av hästens KCNH2-kanal och elektrofysiologi

Eftersom effekten av moxifloxacin på hästens KCNH2-kanaler inte undersökts tidigare var det naturligt att innefatta en laboratoriedel i studien där effekten av moxifloxacin på heterologt uttryckta häst KCNH2-kanaler undersöktes. En tidigare studie i det genteknologiska laboratoriet på fysiologiavdelningen tillhörande Institutet for Klinisk Veterinær- og Husdyrvidenskab, har indikerat på att hästens KCNH2-kanaler uttryckta i *Xenopus*-oocyter kan blockeras av läkemedel på samma sätt som humana KCNH2-kanaler (opublicerad data från Emma Olanders *Masters thesis* 2012).

Många av de läkemedel som blockerar den humana KCNH2-kanalen interagerar med de aromatiska aminosyrorna tyrosin (Tyr652) och fenylalanin (Phe656) på KCNH2-kanalens S6-domäner (Keating & Sanguinetti 2001, Perry et al 2010). Mutagenes av den humana KCNH2-kanalens Phe656 till den neutrala aminosyran alanin ger inte anledning till elimination eller minskning av moxifloxacinmedierad blockad av KCNH2-kanalen. Däremot ger mutagenes av den humana KCNH2-kanalens Tyr652 till alanin anledning till 66 % reduktion av moxifloxacinblockaden (Alexandrou et al 2006). Detta innebär att Tyr652 är viktig för moxifloxacinblockad av KCNH2-kanalen. Vid jämförelse av den humana KCNH2-kanalens aminosyrasekvens (NCBI referens sekvens: NP_000229.1) med hästens KCNH2-kanals aminosyrasekvens (NCBI referens sekvens: NP_001180587.1) finner man att hästens KCNH2-kanal har aminosyran tyrosin i motsvarande region som den humana kanalen. Det verkar därmed som om hästens KCNH2-kanal kan vara mottaglig för moxifloxacinblockad.

Moxifloxacin har en snabb, reversibel blockad av KCNH2-kanalen. Blockaden är spänningsberoende och oberoende av stimuleringsfrekvens (Alexandrou et al 2006). Effekten av moxifloxacin på humana KCNH2-kanaler är undersökta i däggdjursceller (HEK293-celler och CHO-celler). I dessa studier observerades en inhibering på 50 % av "tail"-strömmen (IC_{50}) vid en moxifloxacin-koncentration på 65-129 μM i rumstemperatur (Bischoff et al 2000, Kang et al 2001, Alexandrou et al 2006). Detta motsvarar inte resultatet vid denna studie, där det vid en moxifloxacin-koncentration på 1 mM endast observerades en inhibering av "tail"-strömmen på 34,8 ($\pm 19,8$) %. Trots en viss inhibering av "tail"-strömmen var resultatet inte signifikant, vilket beror på det låga antalet oocyter som undersöktes och den relativt stora spridningen på mätningarna. Orsaken till att så få oocyter undersöktes berodde på att det inte fanns mer moxifloxacin tillgängligt till att kunna undersöka fler. Det berodde också på att efter att ha fått bra mätningar på en del oocyter uppstod helt plötsligt sämre mätningar på följande oocyter vilket beskrivs senare i diskussionen. Dock tyder resultaten på att moxifloxacin har en inhiberande effekt på hästens KCNH2-kanal.

Det finns inga publikationer i författarens kännedom, där effekten av moxifloxacin på humana KCNH2-kanaler har undersökts i *Xenopus*-oocyter som användes vid denna studie. Att effekten av moxifloxacin är mindre än förväntat vid försöket kan bero på olika faktorer.

Effekten på den humana KCNH2-kanalen är undersökt i däggdjursceller utan samtidig expression av den accessoriska subenheten MiRP1 (Bischoff et al 2000, Kang et al 2001, Chen et al 2005, Alexandrou et al 2006). Därför undersöktes moxifloxacins effekt på hästens KCNH2-kanaler utan samtidig expression av den accessoriska subenheten i detta försök. Det ska dock observeras att strömmen genom humana KCNH2-kanalerna uttryckta i däggdjursceller liknar I_{Kr} -strömmen i hjärtat mer än vad strömmen genom humana KCNH2-kanaler uttryckta i *Xenopus*-oocyter gör (Weerapura et al 2002). Därför är det mer riktigt att välja däggdjursceller för att kunna förutse blockeringspotensen av ett läkemedel på I_{Kr} -strömmar i hjärtat (Witchel et al 2002).

För somliga läkemedel som blockerar den humana KCNH2-kanalen i däggdjursceller kan blockad av humana KCNH2-kanaler i *Xenopus*-oocyter inte påvisas. Detta gäller till exempel för klass III antiarytmiska läkemedlet sotalol och makrolidantibiotikan erythromycin (Witchel et al 2002).

Moxifloxacin verkar inte tillhöra dessa läkemedel eftersom det dock ses en liten grad av inhibering. Nästan alla läkemedel visar en lägre potens för blockad av den humana KCNH2-kanalen i *Xenopus*-oocyter jämfört med i däggdjursceller (Thomas et al 2001). IC_{50} -värdet för ett läkemedel kan vara mellan 3-20 gånger högre vid användning av *Xenopus*-oocyter jämfört med användning av

däggdjursceller (Obers et al 2010). En förklaring till detta kan vara det höga innehållet av äggula inuti oocyterna som kan absorbera läkemedlet när det befinner sig intracellulärt, vilket därmed sänker den effektiva koncentrationen av fritt läkemedel som kommer i kontakt med cellmembranet (Thomas et al 2001, Obers et al 2010). Dock är moxifloxacin ett hydrofilt ämne (Varanda et al 2005) som inte borde absorberas av den fetthaltiga äggulan. Vitellinmembranet som ligger utanför oocyternas cellmembran fungerar ytterligare som en fysisk barriär som minskar den effektiva koncentrationen av läkemedel som kommer i kontakt med cellmembranet (Madeja et al 1997).

Moxifloxacin visar en högre grad av ströminhibering genom KCNH2-kanalerna när membranet blir mer depolariserat för att nå en platåfas vid +10 mV, vilket tyder på att moxifloxacin har en spänningsberoende blockad (Alexandrou et al 2006). Protokollet använt vid de elektrofysiologiska mätningarna med hästens KCNH2-kanal valdes i enlighet med tidigare studier gjorda på kanalen i det genteknologiska laboratoriet på fysiologiavdelningen tillhörande Institutet för Klinisk Veterinär- og Husdyrvidenskab. Depolarisering till -10 mV användes i försöket, jämfört med depolarisering till +20 mV som använts i studier där moxifloxacin studerats på humana KCNH2-kanaler i däggdjursceller (Bischoff et al 2000, Kang et al 2001, Chen et al 2005, Alexandrou et al 2006). Eftersom moxifloxacin har en högre grad av inhibering vid depolarisering till mer positivt membranpotential, kan det faktum att en lägre depolarisationsnivå användes i försöket bidra till förklaringen av den låga inhiberingsgrad som observerades.

Spekuleras att moxifloxacin blockerar hästens KCNH2-kanaler på samma vis som humana KCNH2-kanaler och att moxifloxacin har ett 20 gånger högre IC₅₀-värde vid blockad av KCNH2-kanaler i *Xenopus*-oocyter jämfört med i däggdjursceller, så skulle IC₅₀-värdet ligga på mellan 1,3-2,58 mM (20*65-129 µM). Då där i detta försök med hästens KCNH2-kanaler observerades en inhibering på 34,8 (±19,8) % vid 1 mM moxifloxacin skulle det eventuellt kunna vara möjligt att se en inhibering på 50 % vid en koncentration upp till 1,3-2,58 mM. Detta skulle kunna undersökas genom att använda sig av högre moxifloxacin-koncentrationer vid de elektrofysiologiska undersökningarna, vilket dock inte fanns tillgängligt vid denna undersökning. Alternativt kan humana KCNH2-kanaler uttryckta i *Xenopus*-oocyter undersökas för moxifloxacininhibering för att se om det även då föreligger nedsatt inhiberingsgrad jämfört med i däggdjursceller. Skulle där ses en motsvarande grad av moxifloxacininhibering vid humana KCNH2-kanaler i *Xenopus*-oocyter som vid hästens KCNH2-kanaler i *Xenopus*-oocyter, tyder det på att potensen av

moxifloxacinblockaden är lika för de båda kanalerna. Ett tredje alternativ är att undersöka effekten av moxifloxacin på hästens KCNH2-kanaler uttryckta i däggdjursceller.

Emellertid kan det ju också vara så att detta försökets resultat stämmer och att hästens kanaler faktiskt är mindre mottagliga för blockad av moxifloxacin jämfört med humana KCNH2-kanaler. Detta kan man först veta när man gjort fler undersökningar.

Anmärkningsvärda mätningar på oocyter

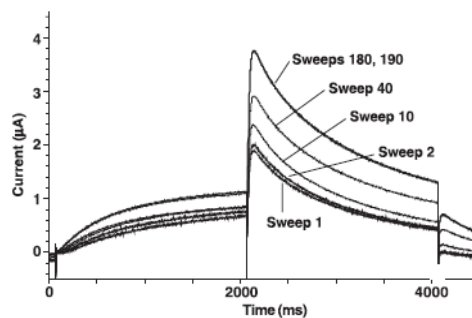
Vid slutet av de elektrofysiologiska mätningar på *Xenopus*-oocyterna steg ”tail”-strömmen genom KCNH2-kanalerna hos några oocyter när flödet ändrades från endast kulori till kulori-moxifloxacinlösning. Detta kan ha orsakats av flera faktorer. Under de elektrofysiologiska mätningarna gick det åt en stor mängd kulori då det användes ett konstant flöde och kulori fick fyllas på upprepade gånger. Flaskan med nytt kulori förvarades i ett kylskåp (cirka 5°C), och vid påfyllnad var temperaturen på kulori lägre än den var för kulori-moxifloxacinlösningar som inte fylldes på under försökets gång. Temperaturskillnaden kan ha påverkat kinetiken av KCNH2-kanalerna som är protein anpassade till att fungera i kroppstemperatur. Den lägre temperaturen kan ha gett nedsatt kinetik och mindre ström genom kanalerna. Ytterligare en faktor som kan ha påverkat mätningarna är flödes hastigheten av kulori och kulori-moxifloxacinlösningarna. Flödet i ett sådant system drivs av vätskepelaren i sprutorna (se figur 18). Efterhand som försöket pågick och nivån minskade i de olika sprutorna bör flödes hastigheten ha minskat vilket kan ha påverkat mätningarna på oocyterna. Nivån i sprutan med kulori var mot slutet av de elektrofysiologiska mätningarna oftast högre än nivån i moxifloxacinsprutorna och därför var flödes hastigheten störst för kulori. Dock är det känt att nedsatt flödes hastighet ger anledning till en minskning i ”tail”-strömmen (Witchel et al 2002), vilket är tvärtemot det problem som sågs. Därför antas den eventuella minskningen i flödes hastigheten på grund av olika nivåer i sprutorna, inte vara av betydelse.



Figur 18: Flödessystem som användes i den elektrofysiologiska undersökningen. Kulori och kulori-moxifloxacinlösningarna fylldes på i sprutorna.

Ett problem som kan ses när KCNH2-kanaler uttrycks i *Xenopus*-oocyter är en progressiv ökning i strömamplituden vid upprepade repetition av ett depolariseringsprotokoll, vilket på engelska kallas "current run up" (se figur 19) (Witchel et al 2002). Dessa små ökningar i strömmen kan fortsätta att ske i upp till 75 eller fler efterföljande depolariseringar innan stabilisering sker. Detta kan leda till att kontrollvärdet som tas i början underestimeras och att man får felaktigt högt IC_{50} -värde för det undersökta läkemedlet (Witchel et al 2002). För att undgå fel bör depolariseringsprotokollet köras till strömmen stabiliseras innan mätningar med läkemedel börjar eller så bör de oocyter som uppvisar detta fenomen uteslutas ur studien. "Current run up" är främst ett problem för läkemedel med en långsam effekt på KCNH2 (Witchel et al 2002). För läkemedel som blockerar kanalen snabbt, vilket moxifloxacin gör (Alexandrou et al 2006), brukar "current run up" inte vara ett problem eftersom man förhållandevis snabbt kan erhålla ett ackurat estimat av inhiberingsgrad (Witchel et al 2002). "Current run up" bör därför inte vara den bakomliggande orsaken till den strömstigning som observerades i de sista oocyterna som undersöktes.

Det valdes att utesluta de oocyter där strömmen steg efter att flödet ändrades från kontrollkulori till kulori-moxifloxacinlösningen eftersom detta inte observerades på förrän på de sista oocyterna.



Figur 19: "Current run up" vid heterolog expression av humana KCNH2-kanaler i *Xenopus*-oocyter (Witchel et al 2002).

Klinisk moxifloxacinstudie på häst

Det kliniska försöket var en pilotstudie med syftet att undersöka om oralt administrerat moxifloxacin tolereras väl och ger anledning till en förlängning av QTc-intervallet hos häst. Eftersom det kliniska försöket fungerade som en pilotstudie ingick endast ett litet antal hästar i undersökningen. Det låga antalet försökshästar och den stora spridningen på data gjorde att det inte blev något signifikant resultat i studien. Trots detta observerades en tendens till förlängning av QTc-intervallet vid behandling med moxifloxacin. Vid ANCOVA-analysen förelåg signifikant effekt av behandling på QTc, det vill säga att vilken dag som hästen blev behandlad med moxifloxacin har signifikant effekt på QTc. Denna effekt uppkom högst sannolikt på grund av det låga antalet försökshästar samt att det förelåg relativt stor spridning på QT-mätningarna. Innebörden i detta är att det vid framtida studier bör användas fler försökshästar för att inte observera en signifikant effekt av behandlingsdag på QTc.

Korrektion och variation av QT-intervallet

Grunden för att den kliniska studien kunde genomföras är det arbete Pedersen et al (2013) gjorde där man försökte etablera referensvärden på QT-intervallet hos hästar samt finna en modell för hur man bäst korregerar hästars QT-intervall för hjärtfrekvensen. Pedersen et al (2013) beskrev den styckvis linjära regressionsmodell som använts till att korrigera QT-intervallen för hjärtfrekvens i denna studie. Dock ska man ha i åtanke att Pedersen et al (2013) gjorde studien på vältränade travhästar medan hästarna i denna studie var otränade och av olika raser. Det kan ju vara så att den styckvis linjära regressionsmodellen som stämmer väl in på vältränade travhästar i verkligheten stämmer mindre bra in på de försökshästar som ingick i studien. Om det föreligger stor skillnad mellan olika hästraser och olika träningsgrad kan det bidra till ett felaktigt resultat.

Ett viktigt problem att ta hänsyn till vid mätning och jämförelse av QTc-intervall är dels intersubjekt variabiliteten och dels intrasubjekt variabiliteten som beror på många faktorer, bland annat aktivitetsnivå, ändringar i kroppshållning, dygnsrytm och födointag. För att komma åt och korrigera för detta problem är det viktigt att uppta flera "baseline"-mätningar för varje individ och göra tidsmatchade jämförelser mellan mätningar på samma individ (Malik et al 2010). Vid denna studie användes den strategi som vanligen används vid en tvärsnittsstudie. "Baseline"-mätningar upptaget innan behandling användes för att korrigera för intersubjekt variabiliteten och tidsmatchade jämförelser efter behandling användes för att korrigera för dygnsrytmen (intrasubjekt variabilitet). Vid ANCOVA-analysen observerades signifikant effekt av baseline på QTc. Detta innebär att det föreligger intervariabilitet mellan hästarna och att QTc måste korrigeras för baseline innan QTc för de olika hästarna jämförs. Hästars dygnsvariation på EKG finns inte beskrivet. Om hästars dygnsrytm för QT-intervallet har stor variation men varierar på samma sätt för den enskilda hästen varje dag så korrigeras det för detta genom att använda den ovannämnda strategin och det bör alltså inte inverka på resultatet. Om variationen på QT-intervallet däremot är olika varje dag är det felaktigt att använda denna strategi och det kan bidra till en stor spridning på uppmätt data. Hade dygnsvariationen hos häst varit karaktäriserad hade det gått att uttala sig huruvida den kan vara en bakomliggande faktor till den stora spridningen som observerades på data i studien. Därför är det motiverat att försöka karaktärisera dygnsvariationen hos häst i framtida studier.

QT-"lag" innebär en försenad anpassning av QT-intervallet till en ändring i RR-intervallet (Pueyo et al 2003). QT-"hysteresis" är en form av QT-"lag" karaktäriserad av att QT-intervallet blir längre vid ett givet RR-intervall när hjärtfrekvensen ökar vid träning och att QT-intervallet blir kortare vid samma RR-intervall när hjärtfrekvensen minskar vid återhämtning (Pelchovitz et al 2012). Mekanismen för detta är okänd. QT-"lag" kan ge anledning till signifikanta fel vid korrektion av QT-intervallet för hjärtfrekvensen (Pueyo et al 2003). Det saknas en beskrivelse av QT-"lag" hos häst. Eventuell förekomst av QT-"lag" i denna studie där hästarna stod lugnt i sina boxar under hela upptagelsen bör vara minimal. Risken för QT-"lag" vid mätning av QT-intervallen minskades ytterligare genom att det eftersträvades att göra mätningarna vid stabil puls. Därför bör inte detta ha inverkat på resultaten i studien.

Avläsning av EKG

Vid en grundlig QT-studie ska EKG-avläsningen ske blint, det vill säga att den som avläser ska inte veta behandling, tid eller vilken individ EKG-upptagningen kommer ifrån, och en person bör avläsa

alla EKG-upptagningar från en individ (ICH Topic E14, 2005). Inter- och intraobservatörs variabilitet vid mätning av QT-intervall kan uppskattas genom att avläsarna avläser en del av EKG-upptagningarna igen under blinda förhållanden. I denna studie skedde mätning av QT-intervallen endast en gång och enbart av författaren själv som endast fått en kort introduktion till att mäta QT-intervall. Genom att endast författaren själv gjort avläsningen föreligger ingen interobservatörs variabilitet. Den i en tidigare studie undersökta inter- och intraobservatörs variabilitet för erfaren och oerfaren EKG-avläsare vid mätning av QT-intervall hos häst var i storleksförhållande med vad som ses humant med erfarna EKG-avläsare (Panicker et al 2009, Pedersen et al 2013). Deras repeterbarhet (intraobservatörs variabilitet) innebar att 95 % av skillnaderna mellan två mätningar låg under 5,64 millisekunder (Pedersen et al 2013). Spridningen på uppmätt data i denna studie var så stor att en intraobservatörs variabilitet i motsvarande storlek (5,64 millisekunder) inte anses ha någon större betydelse för resultatet. Däremot kan en större intraobservatörs variabilitet vara en bidragande orsak till den stora spridningen av uppmätt data. Intraobservatörs variabiliteten i denna studie är inte mätt men borde ha blivit det för att kunna uttala sig om huruvida den stora spridningen på data delvis kan bero på en stor intraobservatörs variabilitet i mätning av QT-intervallen. Då det ofta var lite stök på den isoelektriska grundlinjen så var det svårt vid vissa tidpunkter att definiera var T-vågen slutade och felmätning av en del QT-intervall kan vara en bidragande faktor till den stora spridningen som observerades av data.

Moxifloxacin i plasma

Denna studie var inte tänkt som en farmakokinetisk undersökning utan blodprov uttogs för att påvisa att moxifloxacin blev absorberat från tarmkanalen. Det uttogs blodprov vid samma tidpunkter båda försöksdagarna för att hästarna skulle genomgå samma behandling de båda dagarna. Bortsett från nollprovet hos de hästar som behandlades med placebo den andra behandlingsdagen så analyserades inte blodproven från de dagar som hästarna behandlades med placebo. Anledningen till att dessa nollprov analyserades var för att kontrollera att dessa hästar eliminerat moxifloxacin som de behandlats med sex dagar tidigare. Optimalt skulle det vara sju dagar mellan de två försöksdagarna för att ha en period på fem halveringstider för utrensning mellan behandlingarna, men av praktiska skäl var det bara möjligt att ha sex dagar emellan. Moxifloxacin kunde inte påvisas hos de två hästar som behandlats med moxifloxacin den första dagen och därmed bör det inte kunna ses en effekt av moxifloxacin hos dem vid den andra försöksdagen. Det föreligger en misstanke om att den beskrivna halveringstiden av moxifloxacin på 33,98 timmar hos hästar (Gardner et al 2004) är för lång. Detta på grund av att det föreligger en

relativt konstant halveringstid av fluorokinolonantibiotika hos däggdjur (Papich & Riviere 2009) och att halveringstiden av moxifloxacin är omkring tio timmar hos apor, hundar, minigrisar och människor (Siefert et al 1999).

I humanstudier används som standard en oral dosering på 400 mg moxifloxacin till en vuxen människa som positiv kontroll vid grundliga QT-studier av nya läkemedel (Malik et al 2010). Det uppnås då i genomsnitt en maximal blodkoncentration ($C_{\max}$) på mellan 2-3 µg/ml cirka två timmar ($T_{\max}$) efter intaget av moxifloxacin (Stass & Kubitza 1999b, Démolis et al 2000, Bloomfield et al 2008, Taubel et al 2012). En dosering på 400 mg till människor motsvarar en dosering på 5,7 mg/kg kroppsvikt vid en genomsnittsvikt på 70 kg (Grosjean & Urien 2012). I den enda studien som gjorts på häst där moxifloxacin administrerats per oralt användes en dosering på 5,8 mg/kg kroppsvikt (Gardner et al 2004). Gardner et al (2004) administrerade moxifloxacin dagligen tre dagar i sträck och blodprov för att analysera blodkoncentrationen började tas i samband med den tredje behandlingen. Den genomsnittligt maximala blodkoncentrationen som sågs 2,75 timmar efter behandling var 3,12 µg/ml vilket är i storleksordning med den maximala blodkoncentration som ses humant efter en behandling med 400 mg moxifloxacin. Om den beräknade halveringstid av moxifloxacin hos häst på 33,98 timmar stämmer får det antas att det förekommit en viss ackumulation av moxifloxacin i hästarna. Detta innebär att det inte kan förväntas att få samma maximala blodkoncentration efter endast en oral behandling med motsvarande dos.

Det ska observeras att endast preliminära resultat från studiens blodprovsanalysering finns presenterade. Varken $C_{\max}$ eller $T_{\max}$ är beräknade, utan det är blott blodkoncentrationerna uppmätt vid de olika tidpunkterna som diskuteras i det följande. Det orala upptaget var jämt hos de tre hästarna i studien och den högsta blodkoncentrationen observerades vid första blodprovet 30 minuter efter behandling för att sedan minska. Den genomsnittliga högsta blodkoncentrationen som observerades var 2,26 ($\pm 0,17$) µg/ml, vilket som förväntat var något mindre än vad som sågs hos hästarna i studien gjord av Gardner et al (2004), men som var i nivå med vad som ses humant efter en behandling med 400 mg moxifloxacin.

Något som däremot var lite anmärkningsvärt är att koncentrationen var högst i det första blodprovet som togs redan en halvtimme efter behandling med moxifloxacin. Detta kan jämföras med att $C_{\max}$ hos människor observeras cirka 2 timmar efter behandling och tidigare hos häst har $C_{\max}$ observerats 2,75 timmar efter behandling (Stass & Kubitza 1999b, Démolis et al 2000, Gardner et al 2004, Bloomfield et al 2008, Taubel et al 2012). En anledning som kan göra att den högsta

koncentrationen observerades så tidigt i denna studie jämfört med hos människor är att människor får en tablett som ska disintegreras och lösas upp i vätskan i tarmen innan moxifloxacin kan börja absorberas. Detta ger en fördröjning innan plasmakoncentrationen stiger. I denna studie krossades moxifloxacin-tabletterna och administrerades upplöst i vatten, vilket bör göra att absorptionen kan ske snabbare. Något som inte kan förklaras med detta resonemang är den senare uppnådda $C_{\max}$ hos hästar som observerades av Gardner et al (2004) där dosering skedde på liknande sätt. Skillnaden mellan studierna är att i deras studie var hästarna fastande vid behandling medan hästarna hade tillgång till foder under denna studie. Jämförs detta med vad som observeras humant så borde det kunna leda till att absorptionen är långsammare hos hästar som samtidigt har tillgång till foder eftersom humant blir absorptionen fördröjd och reducerad vid samtidigt intag av mat (Lettieri et al 2001). Dock är det precis det omvända som observeras i denna studie.

Blodkoncentrationen av moxifloxacin hos hästarna i försöket motsvarar vad som observeras hos människor när förlängning av QTc-intervallet kan påvisas. Moxifloxacin har en koncentrationsberoende effekt på QTc-intervallet (Grosjean & Urien 2012). Detta innebär att effekten av moxifloxacin på QTc-intervallet hos människor är störst när plasmakoncentrationen är omkring $C_{\max}$ (Yan et al 2010, Grosjean & Urien 2012). I denna studie var koncentrationen av moxifloxacin störst vid första blodprovet 30 minuter efter behandling med moxifloxacin. Om det förhåller sig som hos människor är det alltså runt 30 minuter efter behandling som den största effekten på QTc-intervallet borde observeras. Tendensen till en ökning av QTc-intervallet som observerades först efter 2 timmar (se figur 15) stämmer inte överens med detta. Det kan innebära att tendensen till den ökning av QTc-intervallet som observerades uppkom helt slumpmässigt och att moxifloxacin inte ger förlängt QTc-intervall hos häst. Eller kan det vara studien som inte är tillräckligt sensitiv för att påvisa en så liten förlängning av QTc-intervallet som moxifloxacin ger anledning till hos människor. För att klargöra detta krävs fler undersökningar där fler hästar ingår.

Uppföljning av hästarna

Moxifloxacinadministreringen tolererades väl av hästarna. Det observerades inga biverkningar hos hästarna efter dosering med moxifloxacin. I den tidigare studien där hästar fått moxifloxacin administrerat oralt observerades mild diarré hos 4/6 hästar cirka åtta timmar efter första administrationen av moxifloxacin (Gardner et al 2004). Skillnaden mellan studierna är att hästarna var fastande innan och efter moxifloxacindoseringen i studien gjord av Gardner et al (2004) medan samtliga hästar i detta försök hade tillgång till stråfoder både innan och efter behandling.

Kön

I denna studie användes endast ston. Från humansidan är det känt att kvinnor har ett längre QTc-intervall än män och har en större risk att utveckla läkemedelsinducerat förlängt QTc-intervall, vilket man delvis tror beror på de kvinnliga könshormonen (Coker 2008). Därför rekommenderas det att både män och kvinnor i samma antal ska ingå i grundliga QT-studier (Malik et al 2010). Hos hästar föreligger också en skillnad i QTc-intervallet mellan könen, där hingstar har signifikant längre QTc-intervall jämfört med ston och valacker (Pedersen et al 2013). Anledningen till detta är inte beskrivet. Därför bör man inkludera båda könen i studier där läkemedels effekt på QTc-intervallet undersöks i framtiden för att eventuellt undersöka om det kan påvisas någon skillnad i effekten mellan könen.

Andra läkemedel som kan undersökas

Det finns en rad läkemedel tillhörande olika farmakoterapeutiska grupper som har en förlängande effekt på QTc-intervallet och/eller kan inducera TdP, och en lista på dem kan finnas på följande webbplats <http://www.azcert.org/medical-pros/drug-lists/printable-drug-list.cfm> (2012-01-07). Om man vill undersöka ett annat läkemedel som eventuellt skulle kunna fungera som positiv kontroll hos häst hade man kunnat välja läkemedel tillhörande klass III antiarytmiska läkemedel, så som sotalol, amiodarone, dofetilide och ibutilide. Denna klass av antiarytmiska läkemedel är designade för att ge en förlängning av ventriklarnas repolarisation vilket därmed ger en förlängning av QTc-intervallet. Dessa läkemedel verkar i huvudsak genom att blockera KCNH2-kanalen (I_{Kr}) (Shah 2005). Ibutilide har tidigare blivit använd som positiv kontroll vid en grundlig QT-studie humant (Beasley et al 2005), men har till författarens kännedom inte undersökts hos häst. Däremot hade man kunnat välja intravenös behandling med amiodarone, som tidigare undersökts hos häst och som vid kortare tids administrering tolererats väl samt gett anledning till signifikant ändring av QT-intervallet, dock inte mätt på samma vis som i denna studie (Trachsel et al 2004, De Clerq et al 2006a, De Clerq et al 2006b, De Clerq et al 2007a, De Clerq et al 2007b). Ytterligare en fördel med amiodarone jämfört med andra läkemedel som tillhör klass III antiarytmika, är att amiodarone har lägre risk för att inducera TdP (Camm & Yap 1999). Amiodarone blockerar inte KCNH2-kanalen specifikt utan den påverkar även andra jonkanaler i hjärtat (Witchel & Hancox 2000). Ett annat klass III antiarytmisk läkemedel som blockerar KCNH2-kanalen relativt specifikt är dofetilide (Jurkiewicz & Sanguinetti 1993). Till skillnad från moxifloxacin vars QTc-förlängande effekt inte påverkas av hjärtfrekvensen (Démolis et al 2000) så har dofetilide ”reverse-use dependence”, vilket innebär att dofetilide har en större effekt på QTc-intervallet vid lägre hjärtfrekvens (Camm & Yap

1999). Eftersom hästar vid vila har så förhållandevis låg hjärtfrekvens innebär detta att dofetilide kan ha en stor effekt på QTc-intervallet, om I_{Kr} -strömmen är lika viktig för ventrikelrepolarisationen hos hästar som hos människor. Administration av dofetilide till häst är inte undersökt tidigare och dofetilide är dessutom associerad med en större risk för utveckling av TdP än amiodarone (Pedersen et al 2007), varför det kan vara att föredra att undersöka effekten med amiodarone framför dofetilide.

Quinidine är ett läkemedel som ger anledning till förlängning av QTc-intervallet humant (Shah 2002) och som används till behandling av förmaksflimmer hos hästar (Reef et al 1995). På grund av att quinidine har ett smalt terapeutisk index hos häst (Finley et al 2003) är det inte lämpligt att försöka etablera quinidine som positiv kontroll till studier hos häst.

Hästar och läkemedelsinducerat LQTS

Som nämnt i introduktionen har ett antal läkemedel blivit borttagna från marknaden eller fått stränga restriktioner i sin distribution på grund av att de förlänger QTc-intervallet och kan inducera arytmier humant. När läkemedel blir borttagna från den humana marknaden försvinner även potentiella läkemedel som används inom veterinärmedicin trots att det är oklart om dessa djur också är i risk för att utveckla LQTS eller ventrikulära arytmier (Finley et al 2003). Eftersom hästar uttrycker den jonkanal ($KCNH2$) som oftast blockeras av läkemedel involverade i läkemedelsinducerat LQTS (Finley et al 2002) kan det innebära att de också kan få inducerat denna form av LQTS. Dock kan det faktum att hästar även har den repolariserande strömmen I_{Kur} i ventriklarna, som inte finns i ventriklarna hos människor (Finley et al 2003), och den variation som föreligger hos olika djurarter i respons till läkemedel som blockerar I_{Kr} -strömmen (Lu et al 2001), innebära att hästar inte är lika mottagliga för läkemedelsinducerat LQTS som människor. Det enda sättet att få reda på mer om detta är att göra studier där olika läkemedels effekt på QTc-intervallet undersöks. Denna studie med administration av moxifloxacin har inte kunnat påvisa en signifikant förlängning av QTc-intervallet. Baserat på den genomsnittliga standardavvikelsen på $\Delta\Delta QTc$ som observerades i denna studie skulle mellan 200-300 hästar behöva ingå i en liknande studie för att kunna påvisa en sann QTc-förlängning på omkring 10 millisekunder med en signifikansnivå på 5 % och en "power" på 90 %. Att ha så många hästar i en klinisk studie är inte praktiskt möjligt. Den stora spridningen på QT-mätningarna gör att administration av moxifloxacin oralt till hästar inte fungerar lika väl som hos människor till att påvisa en förlängning av QTc-intervallet på omkring 5-10 millisekunder.

Konklusion

Denna studie konkluderar att trots ingen signifikant effekt erhöles, har moxifloxacin en viss inhiberande effekt på K^+ -strömmen genom hästens KCNH2-kanaler när dessa uttrycks heterologt i *Xenopus*-oocyter. Eftersom där observerades en viss inhiberande effekt på strömmen genom hästens KCNH2-kanaler av moxifloxacin indikerar detta att moxifloxacin kan ha en inhiberande effekt på KCNH2-kanalen även in vivo. Därmed kan moxifloxacin eventuellt ge en påverkan på ventriklarnas aktionspotential på grund av en minskning av I_{K_r} -strömmen. Detta kan resultera i ett förlängt QTc-intervall om I_{K_r} -strömmen har lika stor betydelse för repolarisationen hos häst som hos människor. Dock kan moxifloxacins eventuellt lägre potens till att blockera hästens KCNH2-kanal jämfört med humana kanaler innebära att moxifloxacin inte ger en nämnvärd påverkan på QTc-intervallet hos häst vid samma blodkoncentration av moxifloxacin som observeras humant.

Engångs oral dosering med moxifloxacin absorberas snabbt och tolereras väl av hästar. När effekten på QTc-intervallet av oralt administrerat moxifloxacin undersöktes, påvisades ingen signifikant effekt på grund av stor spridning av data. Dock observerades en tendens till att där sker en förlängning av QTc-intervallet. Tendensen till förlängning av QTc-intervallet kom inte i samband med att blodkoncentrationen av moxifloxacin var störst. Detta kan innebära att tendensen till förlängt QTc-intervall uppkom slumpmässigt eftersom störst effekt på QTc-intervallet humant observeras när blodkoncentrationen av moxifloxacin är störst. Enligt studiens resultat kan man inte konkludera att moxifloxacin ger anledning till LQTS hos hästar och på grund av så stor spridning av data kan man inte heller avvisa att moxifloxacin ger anledning till LQTS hos hästar.

Avslutningsvis kan resultatet från denna studie inte användas till att konkludera att det går att inducera LQTS med läkemedel hos häst och det kan inte heller användas till att uttala sig om hur viktig I_{K_r} -strömmen är för ventriklarnas repolarisation hos hästar.

Perspektivering

För att fastställa om hästens KCNH2-kanaler heterologt uttryckta är mindre eller lika sensitiva för blockad av moxifloxacin som de humana KCNH2-kanalerna bör ytterligare undersökningar göras. Humana KCNH2-kanaler kan uttryckas i *Xenopus*-oocyter för att undersöka om de visar en lägre inhiberingsgrad av moxifloxacin jämfört med när humana KCNH2-kanaler undersöks i däggdjursceller. Alternativt kan hästens KCNH2-kanaler undersökas i däggdjursceller för att undersöka om de inhiberas av motsvarande moxifloxacin-koncentrationer som de humana KCNH2-kanalerna.

Resultatet från denna studie inte kan användas till att konkludera men inte heller till att avvisa att hästar är mottagliga för läkemedelsinducerat LQTS. Det kvävs fler undersökningar för att klargöra detta. Ytterligare studier med oral administration av moxifloxacin kan med fördel göras eftersom det tolereras väl, där ses en god absorption och det är en förhållandevis enkel studie att utföra. Det är en fördel om fler hästar kan inkluderas i studien för att öka sannolikheten för att få ett signifikant resultat. Karaktärisering av hästars dygnsrytm på EKG kan hjälpa till att avgöra om det är ett korrekt tillvägagångssätt att korrigera för "baseline" och göra tidsmatchade jämförelser av QTc-intervallet på det sätt som gjordes i studien. Vid en liknande studie där ett läkemedels effekt på QTc-intervallet undersöks bör mätning av QT-intervallen göras av minst två avläsare. Inter- och intraobservatörs variabiliteten mellan avläsarna bör undersökas för att göra resultatet mer tillförlitligt. Även andra läkemedel som förlänger QTc-intervallet humant kan undersökas hos hästar för att se om de är mottagliga för läkemedelsinducerat LQTS. Till exempel kan läkemedel från klass III antiarytmika väljas eftersom deras funktion är att förlänga repolarisationen.

Referenser

<http://www.azcert.org/medical-pros/drug-lists/printable-drug-list.cfm> (2012-01-07)

<http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/cardio/ECGbasics.htm>

Abbott G.W., Sesti F., Splawski I., Buck M.E., Lehmann M.H., Timothy K.W., Keating M.T. & Goldstein S.A.N. (1999) MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97:175-187

Alexandrou A.J., Duncan R.S., Sullivan A., Hancox J.C., Leishman D.J., Witchel H.J. & Leaney J.L. (2006) Mechanism of hERG K^+ channel blockade by the fluoroquinolone antibiotic moxifloxacin. *British Journal of Pharmacology* 147:905-916

Ashcroft F.M. *Ion channels and Disease*. Academic press, kapitel 4,5,6,8,9.

Barhanin J., Lesage F., Guillemare E., Fink M., Lazdunski M. & Romey G. (1996) K_vLqt1 and IsK (mink) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* 384:78-80

Beasley C.M., Mitchell M.I., Dmitrienko A.A., Emmick J.T., Shen W., Costigan T.M., Bedding A.W., Turik M.A., Bakhtyari A., Warner M.R., Ruskin J.N., Cantilena L.R. & Kloner R.A. (2005) The combined use of ibutilide as an active control with intensive electrocardiographic sampling and signal averaging as a sensitive method to assess the effects of tadalafil on the human QT interval. *Journal of American College of cardiology* 46:678-687

Bennett P.B., Yazawa K., Makita N. & George A.L.Jr. (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376:683-685

Bers D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205

Bischoff U., Schmidt C., Netzer R. & Pongs O. (2000) Effects of fluoroquinolones on HERG currents. *European Journal of Pharmacology* 406:341-343

Bloomfield DM, Kost JT, Ghosh K, Hreniuk D, Hickey LA, Guitierrez MJ, Gottesdiener K and Wagner JA. (2008) The effect of moxifloxacin on QTc and implications for the design of thorough QT studies. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 84:4:475-480

Camm A.L. & Yap Y.G. (1999) What should we expect from the next generation of antiarrhythmic drugs? *J Cardiovasc Electrophysiol* 10:307-317

Catterall W. A. (2000a) From ionic current to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25

Catterall W. A. (2000b) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521-555

- Charpentier F., Mérot J., Loussouarn G. & Baró I. (2010) Delayed rectifier K⁺ current and cardiac repolarization. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48:37-44
- Chen X., Cass J.D., Bradley J.A., Dahm C.M., Sun Z., Kadyszewski E., Engwall M.J. & Zhou J. (2005) QT prolongation and proarrhythmia by moxifloxacin: concordance of preclinical models in relation to clinical outcome. *British Journal of Pharmacology* 146:792-799
- Coker S.J. (2008) Drugs for men and women – How important is gender as a risk factor for TdP? *Pharmacology and Therapeutics* 119:186-194
- Cunningham J.G. & Klein B.G. (2007) *Textbook of Veterinary Physiology*, Fourth edition, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri. Kapitel 18-20.
- Curran M.E., Splawski I., Timothy K.W., Vincent G.M., Green E.D. & Keating M.T. (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: *HERG* mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80:795-803
- Darpo B., Nebout T. & Sager P.T. (2006) Clinical evaluation of QT/QTc prolongation and proarrhythmic potential for nonantiarrhythmic drugs: the international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use E14 guideline. *J Clin Pharmacol* 46:498-507
- De Clerq D., Baert K., Croubels S., van Loon G., Maes A., Tavernier R., Deprez P. & De Backer P. (2006a) Evaluation of the pharmacokinetics and bioavailability of intravenously and orally administered amiodarone in horses. (Abstract) *Am J Vet Res* 67:448-454
- De Clerq D., van Loon G., Baert K., Tavernier R., Croubels S., De Backer P. & Deprez P. (2006b) Intravenous amiodarone treatment in horses with chronic atrial fibrillation. *The Veterinary Journal* 172:129-134
- De Clerq D., van Loon G., Baert K., Tavernier R., Croubels S., De Backer P. & Deprez P. (2007a) Effects of an adapted intravenous amiodarone treatment protocol in horses with atrial fibrillation. *Equine Veterinary Journal* 39:344-349
- De Clerq D., van Loon G., Baert K., De Backer P. & Deprez P. (2007b) Treatment with amiodarone of refractory ventricular tachycardia in a horse. *J Vet Intern med* 21:878-880
- Dellmann H.D. & Eurell J. (1998) *Textbook of veterinary histology*, Fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. Kapitel 1, 5.
- Démolis J-L, Kubitz D, Tennezé L and Funck-Brentano C. (2000) Effect of a single oral dose of moxifloxacin (400 mg and 800 mg) on ventricular repolarization in healthy subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 68:6:658-666

- Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T. & MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77
- Dyce K.M., Sack W.O. & Wensing C.J.G. (2007) *Textbook of veterinary anatomy*, Third edition, Saunders, USA. Kapitel 7, 20.
- Evans D. L. & Young L. E. (2010) Cardiac responses to exercise and training. In: *Cardiology of the horse*. Second edition, Ed: Marr C. M. & Bowen M., Saunders Elsevier. Kapitel 3.
- Finley M. R., Li Y., Hua F., Lillich J., Mitchell K.E., Ganta S., Gilmour R.F.Jr. & Freeman L.C. (2002) Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:126-138
- Finley M.R., Lillich J.D., Gilmour R.F.Jr. & Freeman L.C. (2003) Structural and functional basis for the long QT syndrome: relevance to veterinary patients. *J Vet Intern Med* 17:473-488
- Gardner SY, Davis JL, Jones SL, Lafevers DH, Hoskins MS, Mcarver EM and Papich MG. (2004) Moxifloxacin pharmacokinetics in horses and disposition in horses and disposition into phagocytes after oral dosing. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 27:57-60
- Grosjean P and Urien S. (2012) Reevaluation of moxifloxacin pharmacokinetics and their direct effect on the QT interval. *J Clin Pharmacol* 52:329-338
- Grunnet M., Jensen B.S., Olesen S-P. & Klærke D.A. (2001) Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur J Physiol* 441:544-550
- Hedley P.L., Jørgensen P., Schlamowitz S., Wangari R., Moolman-Smook J., Brink P.A., Kanters J.K., Corfield V.A. & Christiansen M. (2009) The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum mutat* 30:1486-1511
- Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I. & Kurachi Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90:291-366
- International Conference on Harmonisation. E14: the clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-arrhythmic drugs. Federal register 2005;70:61134-35.
- International Conference on Harmonisation. E14: the clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-arrhythmic drugs. Questions and answers (R1). 2012
- Jespersen T., Grunnet M., Angelo K., Klærke D.A. & Olesen S.-P. (2002) Dual-function vector for protein expression in both mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes. *BioTechniques* 32:536-540

- Jurkiewicz N.K. & Sanguinetti M.C. (1993) Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III anti-arrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 72:75-83 (KÄLLA 63 I QT VET)
- Kang J., Wang L., Chen X-L., Triggle D.J. & Rampe D. (2001) Interactions of a series of fluoroquinolone antibacterial drugs with the human cardiac K⁺ channel HERG. *Mol Pharmacol* 59:122-126
- Keating M.T. & Sanguinetti M.C. (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104:569-580
- Kuo H-C., Cheng C-F., Clark R.B., Lin J.J-C., Lin J.L-C., Hoshijima M., Nguyễn-Trân V.T.B., Gu Y., Ikeda Y., Chu P-H., Ross J.Jr., Giles W.R. & Chien K.R. (2001) A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KCHIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107:801-813
- Lettieri J, Vargas R, Agarwal V and Liu P. (2001) Effect of food on the pharmacokinetics of a single oral dose of moxifloxacin 400 mg in healthy male volunteers. *Clin Pharmacokinet* 40:1:19-25
- Lu H.R., Marien R., Saels A. & De Clerck F. (2001) Species plays an important role in drug-induced prolongation of action potential duration and early afterdepolarizations in isolated purkinje fibers. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12:93-102
- Malik M., Hnatkova K., Schmidt A. & Smetana P. (2009) Electrocardiographic QTc changes due to moxifloxacin infusion. *Journal of Clinical Pharmacology* 49:674-683
- Malik M., Garnett C.E. & Zhang J. (2010) Thorough QT studies – questions and quandaries. *Drug saf* 33:1-14
- Madeja M., Musshoff U. & Speckmann E-J. (1997) Follicular tissues reduce drug effects on ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*. *European Journal of Neuroscience* 9:599-604
- McDonald T.V., Yu Z., Ming Z., Palma E., Meyers M.B., Wang K-W., Goldstein S.A.N. & Fishman G.I. (1997) A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I_{Kr}. *Nature* 388:289-292
- Nerbonne J.M. (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *Journal of Physiology* 525:2:285-298
- Nerbonne J.M. & Kass R.S. (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85:1205-1253
- Niwa N. & Nerbonne J.M. (2010) Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48:12-25

- Noel G.J., Natarajan J., Chien S., Hunt T.L., Goodman D.B. & Abels R. (2003) Effects of three fluoroquinolones on QT interval in healthy adults after single doses. *Clinical Pharmacology & therapeutics* 73:292-303
- Obers S., Staudacher I., Ficker E., Dennis A., Koschny R., Erdal H., Bloehs R., Kisselbach J., Karle C.A., Schweizer P.A., Katus H.A. & Thomas D. (2010) Multiple mechanisms of HERG liability: current inhibition, disruption of protein trafficking, and apoptosis induced by amoxapine. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 381:385-400
- Olander E. (2012) *Master's thesis*: Action potential repolarization in the equine heart – molecular cloning and expression of KCNQ1 and KCNH2. University of Copenhagen.
- Panicker G.K., Karnad D.R., Natekar M., Kothari S., Narula D. & Lokhandwala. (2009) Intra- and interreader variability in QT interval measurement by tangent and threshold methods in a central electrocardiogram laboratory. *Journal of Electrocardiology* 42:348-352
- Papich M.G. & Riviere J.E. (2009) Fluoroquinolone antimicrobial drugs. In: *Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, Ninth edition, Ed: Riviere J.E. & Papich M.G., Wiley-Blackwell, Iowa. P 992
- Patteson M. (1996) *Equine cardiology*. Backwell Science Ltd, Oxford, p. 1-254.
- Pedersen H.S., Elming H., Seibæk M., Burchardt H., Brendorp B., Torp-Pedersen C. & Køber L. (2007) Risk factors and predictors of torsades de pointes ventricular tachycardia in patients with left ventricular systolic dysfunction receiving *dofetilide*. *Am J Cardiol* 100:876-880
- Pedersen P.J., Kanters J.K., Buhl R. & Klærke D.A. (2013 i bearbetning) Normal electrocardiographic QT interval in race-fit Standardbred horses at rest and its rate dependence during exercise.
- Pelchovitz D.J., Ng J., Chicos A.B., Bergner D.W. & Goldberger J.J. (2012) QT-RR hysteresis is caused by differential autonomic states during exercise and recovery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:2567-2573
- Perry M., Sanguinetti M. & Mitcheson J. (2010) Revealing the structural basis of action of hERG potassium channel activators and blockers. *J Physiol* 588:17:3157-3167
- Pueyo E., Smetana P., Laguna P. & Malik M. (2003) Estimation of the QT/RR hysteresis lag. *Journal of Electrocardiology* 36:187-190
- Reef V.B. & McGuirk S.M. (2009) Diseases of the cardiovascular system. In: *Large animal internal medicine*, Fourth edition, Ed: Smith B.P., Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri. Pp 453-454
- Reef V.B., Reimer J.M. & Spencer P.A. (1995) Treatment of atrial fibrillation in horses: New perspectives. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 9:57-67

Roy M-L., Dumaine R. & Brown A.M. (1996) HERG, a Primary Human Ventricular Target of the Nonsedating Antihistamine Terfenadine. *Circulation* 94:4:817-823

Sanguinetti M.C., Curran M.E., Zou A., Shen J., Spector P.S., Atkinson D.L. & Keating M.T. (1996) Coassembly of K_vLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 384:80-83

Sanguinetti M.C., Jiang C., Curran M.E. & Keating M.T. (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: *HERG* encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 81:299-307

Schaller O. (2007) *Illustrated veterinary anatomical nomenclature*, 2nd edition, Enke verlag, Stuttgart.

Sesti F., Abbott G.W., Wei J., Murray K.T., Saksena S., Schwartz P.J., Priori S.G., Roden D.M., George A.L. & Goldstein S.A.N. (2000) A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *PNAS* 97:19:10613-10618

Shah R.R. (2002) The significance of QT interval in drug development. *J Clin Pharmacol* 54:188-202

Shah R.R. (2005) Drugs, QT interval prolongation and ICH E14 – the need to get it right. *Drug safety* 28:115-125

Siefert H.M., Domdey-Bette A., Henninger K., Hücke F., Kohlsdorfer C. & Stass H.H. (1999) Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolon, moxifloxacin: a comparison in humans and other mammalian species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43:69-76

Silverthorn D.U. (2007) *Human physiology*, Fourth edition, Pearson Education, San Francisco. Kapitel 14.

Splawski I., Shen J., Timothy K.W., Lehmann M.H., Priori S., Robinson J.L., Moss A.J., Schwartz P.J., Towbin J.A., Vincent G.M. & Keating M.T. (2000) Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1*, and *KCNE2*. *Circulation* 102:1178-1185

Splawski I., Timothy K.W., Sharpe L.M., Decher N., Kumar P., Bloise R., Napolitano C., Schwartz P.J., Joseph R.M., Condouris K., Tager-Flusberg H., Priori S.G., Sanguinetti M.C. & Keating M.T. (2004) Ca(V)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119:19-31

Stass H. & Kubitz D. (1999a) Basic Pharmacokinetics of Moxifloxacin. *Drugs* 58:2:225-226

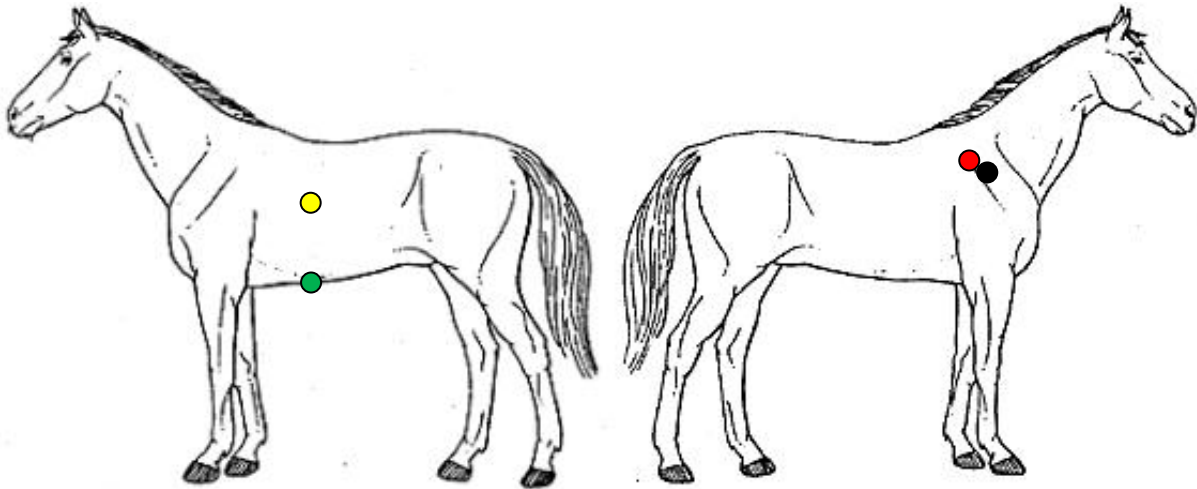
Stass H. & Kubitz D. (1999b) Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43:83-90

- Stylianou A., Roger J. & Stephens K. (2008) A statistical assessment of QT data following placebo and moxifloxacin dosing in thorough QT studies. *Journal of Biopharmaceutical Statistics* 18:502-516
- Suessbrich H., Waldegger S., Lang F. & Busch A.E. (1996) Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Letters* 385:77-80
- Surawicz B. (1989) Electrophysiologic substrate of Torsade de Pointes: Dispersion of repolarization or early afterdepolarizations? *JACC* 14:1:172-185
- Taubel J, Naseem A, Wang D, Arezina R, Lorch U and Camm AJ. (2012) Repeated supratherapeutic dosing of stontium ranelate over 15 days does not prolong QTc interval in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 72:2:296-303
- Thomas D., Wendt-Nordahl G., Röckl K., Ficker E., Brown A.M. & Kiehn J. (2001) High-affinity blockade of human ether-a-go-go-related gene human cardiac potassium channels by the novel antiarrhythmic drug BRL-32872. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 297:753-761
- Trachsel D., Tschudi P., Portier C.J., Kuhn M., Thormann W., Scholtysik G. & Mevissen M. (2004) Pharmacokinetics and pharmacodynamics effect of amiodarone in plasma of ponies after single intravenous administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 195:113-125
- Trudeau M.C., Warmke J.W., Ganetzky B. & Robertson G.A. (1995) HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 269:92-95
- Varanda F., Pratas de Melo M.J., Cacüo A.I., Dohrn R., Makrydaki F.A., Voutsas E., Tassios D. & Marrucho I.M. (2005) Solubility of Antibiotics in Different Solvents. 1. Hydrochloride Forms of Tetracycline, Moxifloxacin, and Ciprofloxacin. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45:6368-6374
- Verheyen T., Decloedt A., De Clercq D., Deprez P., Sys S.U. & van Loon G. (2010a) Electrocardiography in horses – part 1: how to make a good recording. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79:331-336
- Verheyen T., Decloedt A., De Clercq D., Deprez P., Sys S.U. & van Loon G. (2010b) Electrocardiography in horses – part 2: how to read the equine ECG. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79:337-344
- Wagner C.A., Friedrich B., Setiawan I., Lang F. & Bröer S. (2000) The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cellular Physiol Biochem* 10:1-12
- Wang Q., Curran M.E., Splawski I., Burn T.C., Millholland J.M., VanRaay T.J., Shen J., Tiomthy K.W., Vincent G.M., de Jager T., Schwartz P.J., Towbin J.A., Moss A.J., Atkinson D.L., Landes

- G.M., Connors T.D. & Keating M.T. (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature genetics* 12:17-23
- Warmke J.W. & Ganetzky B. (1994) A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3438-3442
- Weerapura M., Nattel S., Chartier D., Caballero R. & Hébert T.E. (2002) A comparison of current carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *Journal of Physiology* 540:1:15-27
- White C.M., Grant E.M. & Quintiliani R. (2001) Moxifloxacin does increase the corrected QT interval. *Clinical Infectious diseases* 33:1441-1442
- Witchel H.J. & Hancox J.C. (2000) Familial and acquired long QT syndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27:753-766
- Witchel H.J., Milnes J.T., Mitcheson J.S. & Hancox J.C. (2002) Troubleshooting problems with in vitro screening of drugs for QT interval prolongation using HERG K⁺ channels expressed in mammalian cell lines and *Xenopus* oocytes. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 48:65-80
- Yan LK, Zhang J, Jee Ng M and Dang Q. (2010) Statistical characteristics of moxifloxacin-induced QTc effect. *Journal of Biopharmaceutical Statistics.* 20:497-507
- Young L.E. (2003) Physiological society symposium – The Athlete’s heart. Equine athletes, the equine athlete’s heart and racing success. *Experimental Physiology* 88.5:659-663

Bilaga I - EKG protokoll

Placering av elektroderna



- Röd elektrod placeras dorsalt på höger scapula.
- Gul elektrod placeras i sadelstadsområdet cirka i den mittersta tredjedelen av thorax.
- Grön elektrod placeras till vänster om xiphoidea.
- Svart elektrod placeras dorsalt på höger scapula.

EKG upptagning

”Baseline”

- Raka hästarna där elektroderna ska sitta, tvätta av med sprit för att få optimal kontakt med elektroderna.
- Klistra fast elektroderna (KRUUSE ECG elektroder, Jørgen KRUUSE, Langeskov, Danmark), sätt på Snögg (Jørgen KRUUSE, Langeskov, Danmark) för att ”förankra” elektroderna ytterligare till huden.
- Sätt på en gjord med EKG-hållare alternativt en elastisk gjord till vilken EKG-upptagaren kan fästas, fäst sladdarna till gjorden så att de inte hänger löst.
- Sätt i ett tomt SD-minneskort i den digitala EKG-upptagaren.
- Sätt i kontakten till sladdarna i EKG-upptagaren, vilket startar EKG-upptagningen. Skriv ner starttidpunkt. Kontrollera att den gröna lampan blinkar, detta indikerar att EKG-upptagelsen sparas på SD-minneskortet.

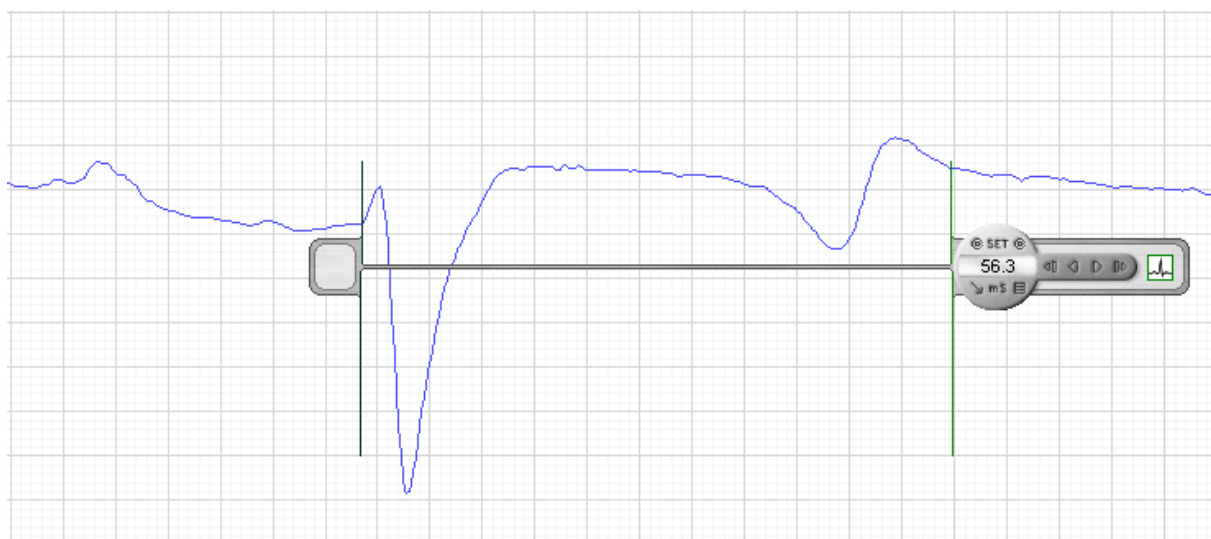
Efter behandling

- Direkt efter behandling dras kontakten till sladdarna ut och sätts in igen för att få den fortsatta upptagningen på en ny fil. Kontrollera att grön lampa blinkar. Skriv ner tidpunkten.
- När EKG-upptagningen ska avslutas dras kontakten ut och utrustningen kan tas av.
- EKG-upptagningsfilerna på minneskortet överförs till en laptop för analysering.

Bilaga II - Protokoll för mätning av QT-intervall

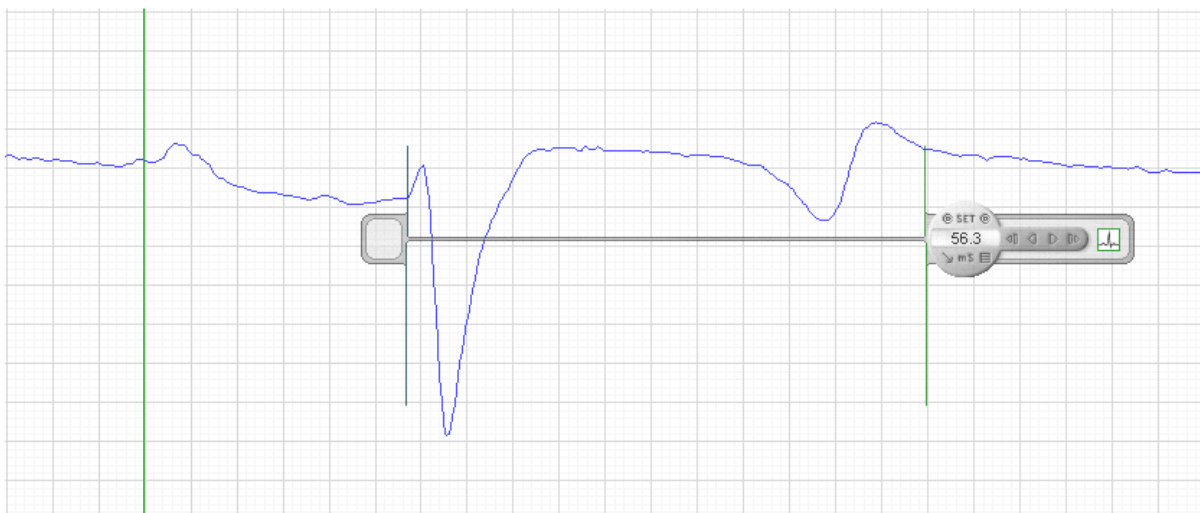
Mätningen av QT-intervallet är gjord manuellt med hjälp av Cardio Calipers 3.3 (ICONICO, New York, NY, USA) i Televet 100 Version 4.2.0. (Roesch & Associates Information Engineering GmbH, Frankfurt am Main, Germany). Vid varje tidpunkt där QT-intervall skulle mätas gjordes följande: fem efterföljande QT-intervaller mättes och därefter beräknades hjärtfrekvensen.

Hjärtfrekvensen beräknades genom användning av de tio hjärtslagen som kom omedelbart före de fem hjärtslag vars QT-intervall mätts. Avläsning av QT-intervallen sker vid pappershastighet ("feed") 200 mm/s. Mätstickan placeras vid Q-vågens början och T-vågens slut (se figur a). Talet som mätstickan visar ska multipliceras med 10 för att få det riktiga måttet på QT-intervallens längd.

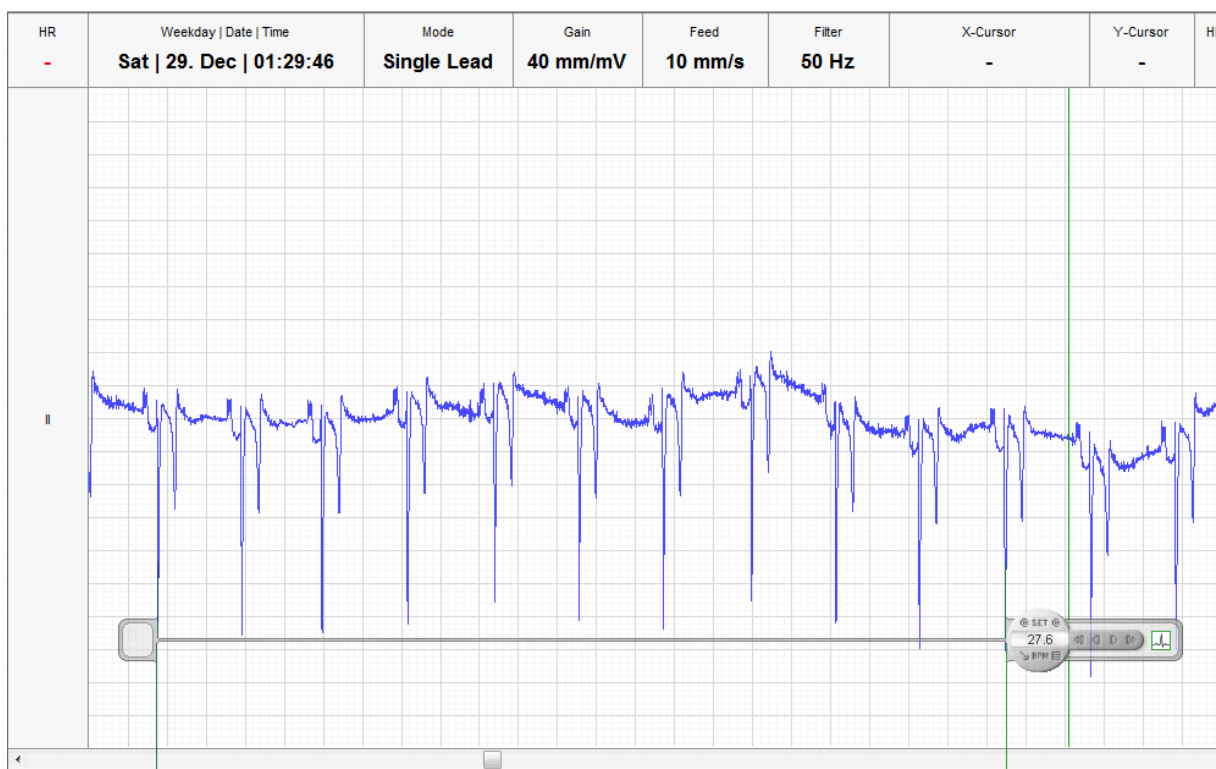


Figur a: Mätning av QT-intervallet (gain=40mm/mV, feed=200mm/s).

En markering gjordes framför det första hjärtslag (se figur b) av de fem vars QT-intervall mättes, för att kunna beräkna hjärtfrekvensen genom användning av de tio föregående hjärtslagen (se figur c). EKG förminskades till en pappershastighet ("feed") på 10 mm/s för att kunna se flera hjärtslag.



Figur b: Markering framför det första hjärtslaget där QT-intervallet mäts.



Figur c: Mätning av hjärtfrekvens.

För varje häst i försöket finns två EKG-filer per försöksdag. En fil upptagen innan behandling (fil1) och en upptagen efter behandling (fil 2). Två filer uppstod som följd av att sticket till EKG-sladdarna drogs ut och sattes in igen i EKG-upptagaren precis efter att hästarna fått sin behandling. Vid öppning av filerna sattes starttiden till noll för att lätt kunna finna avläsningstidpunkterna. På två hästar blev det tre filer den andra försöksdagen på grund av att batterier i EKG-upptagaren var

tvungna att bytas. Batteribytet skedde en tid efter behandling och således är både fil 2 samt 3 upptagna efter behandling. För att det skulle stämma med avläsningstidpunkterna sattes den andra filens längd in som starttid i fil tre, istället för att sätta in starttiden noll som görs när de andra filerna öppnas. Bytet av batterier tog mindre än en minut och den tiden bedöms så liten att det inte tas hänsyn till den när starttiden ställs in vid avläsning av fil 3.

Fil 1: QT-intervallet mäts vid tre tidpunkter, nämligen -1,0; -0,5 och 0 timmar innan behandling. Eftersom behandling gavs under slutet av denna EKG-upptagning bedöms nolltidpunkten vara cirka 10 minuter innan denna fil avslutas. Detta eftersom det tar en liten stund att få ilagt nässvalgsond. Detta gör att -0,5 h tidpunkten är cirka 40 minuter från slutet och -1,0 h tidpunkten cirka 1 timme och 10 minuter från slutet.

Fil 2: QT-intervallet mäts vid 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 4.5 och 5.0 timmar efter behandling. Eftersom det vid tidpunkt 0.5, 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 och 5.0 samtidigt uttagits blodprov kan det ha uppstått stökigheter på EKG-upptagningen. Själva proceduren när blodprov uttogs tog mindre än en minut per gång. Behöver avläsningstidpunkten flyttas används nedanstående beskriva strategi.

Om där vid avläsningstidpunkterna är stökigt på EKG-grundlinjen så att det inte går att avgöra var QRS-komplexet börjar eller T-vågen slutar så kommer avläsningstidpunkten att flyttas till ett område där det inte längre är stök på grundlinjen. För att finna detta område undersöks EKG både ”framför” och ”bakom” avläsningstidpunkten. Först kollas det cirka 15 sekunder längre fram och sen 15 sekunder längre bak. Samma procedur upprepas vid 30 sekunder fram och bak, 45 sekunder fram och bak o.s.v. intill att QRS-komplexets början och T-vågens slut lätt kan definieras. Om där vid avläsning skulle vara stökigt bara vid ett hjärtslag så hoppas det över. Men är det stökigt på flera hjärtslag så förflyttas avläsningstidpunkten enligt strategin nämnd ovan. På samma sätt flyttas avläsningstidpunkten om hjärtfrekvensen inte är stabil där man ska mäta QT-intervallen, till ett ställe där hjärtfrekvensen är stabil.

För att kunna göra en senare kontroll av QT-mätningen, så tas en ”print screen” vid pulsberäkningen (de tio första slagen) vid varje avläsningstidpunkt för att lätt kunna finna avläsningstidpunkterna igen.

All data fördes in i Excel-ark.