

Metadon till hund

Klinisk farmakologi



Anja Holgersson

Handledare: Carina Ingvast-Larsson

Inst. för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Kerstin Olsson

Inst för Anatomi, Fysiologi och Biokemi

Biträdande handledare: Anne-Sofie Lagerstedt

Inst för Kirurgi och Medicin Smådjur

Summary

Methadone is frequently used as an analgesic drug for dogs although there are very few studies describing the pharmacokinetics of methadone in this species. In man methadone has a long half-life and there are considerable differences in pharmacokinetics between individuals. The dose interval is lengthened when the drug is used for longer periods of time due to prolonged half-life. Therefore the drug dose must be adjusted individually. The purpose of this study was to study the fundamental pharmacokinetics of methadone in dogs, and to find an optimal drug dosage. We also measured parameters that are used in pain evaluation because it would be valuable in evaluating the clinical effects of methadone. These parameters were blood plasma concentrations of the hormones vasopressin and cortisol and behavioral studies. Ten clinically healthy Beagles and Beagle crosses were used. Five were males and five females. The design was a crossover study. Five dogs got 0.4 mg/kg of methadone IV and five got 0.4 mg/kg SC after which a three week washout period followed. Due to a misunderstanding, only four dogs then got the drug IV while six dogs got the same dose SC. Plasma concentrations of methadone were analyzed and after IV administration half-life was $3,9 \text{ h} \pm 1,0 \text{ h}$ (average \pm SD). The half-life after SC administration was longer and varied more, it was $10,7 \text{ h} \pm 4,3 \text{ h}$ (average \pm SD). The behavioral study started 40 min after drug administration. The behavior of each dog was also studied on a control day when the dog did not receive methadone. The behavioral study showed that the dogs lied down more after the methadone injection. The dogs whined four and a half times more after methadone injection than during control days. The dogs showed less of the behaviors muscle tremor, snout licking and swallowing. This latter change of behavior was related to lower blood plasma cortisol concentrations after SC administration at 30 min and at 3,6 and 30 hours compared to before methadone injection. In contrast, the cortisol levels were elevated after IV injection at 1 h presumably as a result of drug induced systemic release. However, the changes in behavior were similar after IV and after SC administration. A drug induced rise of the vasopressin levels were recorded at 30 min after IV injection, which is in agreement with a previous study of methadone in dogs. In conclusion, SC administration is to prefer before IV, because of the longer half life that enables longer dose intervals. However, large individual differences in pharmacokinetics were observed after SC administration, which complicates the use of the drug. Methadone has got a sedating effect, reduces stress and dose not induce sickness. We also conclude that plasma concentrations of cortisol and vasopressin increased in relation to the concentration of methadone and are therefore not useful parameters in evaluating pain when methadone has been given. In addition, whining is not a reliable parameter in pain evaluation, because of its increase after methadone administration.

Sammanfattning

Metadon används inom djursjukvården som smärtstillande medel till hund trots att det finns mycket få studier som beskriver dess farmakokinetik hos detta djurslag. Hos människa har metadon lång halveringstid och det finns stora individuella variationer i de farmakokinetiska parametrarna. Därför rekommenderas individanpassad dosering, samt ett utökat dosintervall vid upprepad administrering, pga av förlängd halveringstid. Syftet med denna studie var att göra en grundläggande farmakokinetisk studie på metadon till hund, för att på sikt komma fram till förbättrade doseringsförslag. Vi mätte också parametrar som kan vara av intresse för utvärdering av smärta för att få bättre underlag för metadons effekter under kliniska förhållanden. Plasmakoncentrationerna av hormonerna kortisol och vasopressin analyserades och hundarnas beteende studerades. I studien användes 10 kliniskt friska beaglar och beaglekorsningar. Fem var hanar och fem var tikar. Studien var upplagd som en ”*cross over*–studie”. Hälften av hundarna fick 0,4 mg/kg metadon SC och hälften 0,4 mg/kg IV. Försöket upprepades efter tre veckor. Pga ett missförstånd fick endast fyra hundar metadon IV medan 6 fick läkemedlet SC. Halveringstid efter IV administrering var $3,9 \text{ h} \pm 1,0 \text{ h}$ (medel \pm SD). Efter SC administrering var halveringstiden längre och varierade mer, den var $10,7 \text{ h} \pm 4,3 \text{ h}$. Beteendestudien startade 40 min efter metadoninjektion. Hundarnas beteende studerades dessutom under en kontrolldag utan metadonpåverkan. I beteendestudierna framkom det att metadonpåverkade hundarna låg mer än under kontrollförsöket och att de gnällde 4,5 ggr mer än en opåverkad hund. Stressrelaterade beteenden så som muskelskakningar, sväljningar och att de slickade sig kring munnen minskade efter metadongiva och inga tecken på illamående registrerades. Minskning i stressrelaterade beteenden inföll samtidigt som en sänkning av kortisolkoncentrationen i blodplasma vid 30 min, 3,6 h samt 30 h efter SC administrering. Efter IV injektion fann vi tvärt om en höjning av kortisolvärdet vid 1 h. Detta indikerar att metadon *per se* inducerar kortisolfrisättning eftersom hundarna inte visade mer stressbeteenden efter IV än SC administrering. Vasopressin steg vid 30 min efter IV administrering jämfört med före metadongiva, detta bekräftas av tidigare studier och är sannolikt en följd av läkemedelsinducerad frisättning. Slutsatsen är att SC administrering är att föredra framför intravenös då man kan utnyttja den längre halveringstiden för att få längre dosintervall. Det var dock större individuella variationer i de farmakokinetiska parametrarna efter SC administrering vilket skulle kunna berättiga en behovsanpassad dosering. Sammanfattningsvis hade metadon en sederande effekt och minskade stressen, och gav inte upphov till illamående. I studien framkom att kortisol, vasopressin samt gnäll troligtvis är olämpliga parametrar i smärtutvärdering efter metadongiva

Innehållsförteckning

Inledning	7
Material och metoder	8
Försöksschema	8
Provhantering	9
Hormonanalys	9
Bestämning av metadon i hundplasma	10
Farmakokinetisk analys	11
Beteendestudie	11
Resultat	13
Farmakokinetik	13
Hormoner	15
Kortisol	15
Vasopressin	16
Beteendestudie	16
Ligga	16
Liggpositioner	18
Ögon	18
Övriga beteenden	18
Frekvensstudier	19
Obehag	21
Diskussion	22
Framakokinetik	22
Beteendestudie	23
Tillvänjningseffekt	23

Sedering.....	23
Illamående	24
Gnäll	24
Obehag – Stress	24
Kortisol.....	25
Vasopressin	25
Slutsats.....	26
Tack.....	26
Litteraturförteckning	27
Bilaga: försöksprotokoll.....	29

Inledning

Metadon är idag ej godkänt för användning till hund, men används trots det rutinmässigt som smärtlindrig till detta djuslag. Substansen tillhör liksom morfin opioiderna och är en my-receptor agonist. Till mycket stor del saknas farmakokinetiska studier på metadon hos både hund och andra djurslag (Plumb, 2000). Hund tar inte upp läkemedlet alls efter oral administrering (Kukanich, 2005). Metadon kan ges intravenöst, intramuskulärt eller subkutant (Plumb, 2003). Det finns ett fåtal studier där metadon givits intravenöst (IV) till hund, men endast en (baserad på 3 hundar) efter subkutan (SC) giva. (Schlitt *et al.*, 1978, Stanley *et al.*, 1980, Garret *et al.*, 1985, Shmidt *et al.*, 1994, Kukanich *et al.*, 2005). Studier efter intramuskulär (IM) administrering har inte kunnat hittats i litteraturen.

Hos människa uppvisar metadon en stor distributionsvolym, eftersom plasmaproteinbindningen är mindre än bindningen till vävnaden. (Garrido 1999) Det finns stora individuella farmakokinetiska skillnader, hos människa varför individanpassad dosering rekommenderas. (Fass 2006) Metadons halveringstid uppges vara lång och variera mycket (15-57 h), medan den analgetiska effekten endast varar i 4-6 h efter enkeldos. Effektdurationen förlängs till (8-12 h) vid upprepad giva. Pga av den långa halveringstiden rekommenderas ett dosintervall på 12 h vid upprepad administrering för att undvika läkemedelsackumulering. (Fass 2006)

Det finns mycket som talar för att det kan finnas stora individuella variationer i farmakokinetik även hos hund. Vid intravenös administrering av läkemedlet finns halveringstider mellan 1,75-4,0 timmar angivna i litteraturen (Schlitt *et al.*, 1978, Stanley *et al.*, 1980, Garret *et al.*, 1985, Shmidt *et al.*, 1994, Kukanich *et al.*, 2005). I undersökningen där metadon givits SC fann man en stor individuell variation i kinetik hos nära besläktade hundar. Halveringstiden var ca 4,7 h men varierade från 2 h och upp till 11,7 h (Schlitt *et al.*, 1978). Skulle stora farmakokinetiska individskillnader även finnas hos hund innebär det att man måste bedöma hundens grad av smärta, för att kunna dosera läkemedlet korrekt. Det är mycket svårt att bedöma smärta hos djur. Inom veterinärmedicinen har man gjort försök med en rad olika smärtbedömningscheman som ger olika ”smärtpoäng” för att försöka kvantifiera smärta hos hund. Exempel på beteenden som förekommer i sådana scheman är vokalisering, rörelsemönster, andningsmönster och position (Hansen, 2003).

Det finns också andra sett att bedöma smärta, tex mätning av stresshormonerna vasopressin och kortisol. (Minton, 1994; Molony & Kent, 1997). Det finns emellertid studier som pekar på att metadon kan inducera frisättning av vasopressin i doser över 0,5 mg/kg. (Hellebreakers *et al.*, 1987, Hellebreakers *et al.*, 1989). Vasopressin kallas även ADH antidiuretiskt hormon och har vattensparande effekt i njurarna, men man har inte kunnat visa någon vattenretention efter metadongiva på 1 mg/kg till hund.(Hellebrekers *et al.*, 1987)

Även om det är svårt att bedöma smärta hos hund (Hansen, 2003), finner jag relativt samstämmiga uppgifter om effektduration i litteraturen. Enligt (Pascoe, 2000) tros metadon ha analgetisk effekt i minst fyra timmar. Vilket styrks av en studie där det angavs att effektiv postoperativ smärtlindring erhöles i 3-4 h, efter en IV giva på 1 mg/kg preoperativt samt därefter 0,25-0,5 mg/kg (Dobromylsky, 1993). Vid en korsbandsoperation tog det ca 6,2 h från premedicinering med 0,3 mg/kg IV tills hundarna uppskattades ha måttlig smärta (Leibetseder, Mosing & Jones, 2006).

Det saknas uppgifter om hur metadon skall doseras till hund i vetenskapliga originalartiklar. Enligt Plumb (2005), anges doser mellan 1-1,5 mg/kg med 4-6 h mellanrum, och för preoperativ smärtlindring 0,2-0,5 mg/kg som premedicinering.

Mot bakgrund av att metadons farmakokinetik hos hund är dåligt känd ansåg vi det angeläget att göra en grundläggande farmakokinetisk studie av läkemedlet för att på sikt kunna komma fram till bättre doseringsrutiner för läkemedlet. Då SC administrering är den kliniskt vanligaste administreringsättet inom veterinärmedicinen valde vi att i först hand studera IV och SC administration.

För att kunna göra en så korrekt bedömning av hundarnas smärta som möjligt krävs att man vet hur metadonet i sig påverkar hundarnas beteende. För att ta reda på detta kommer vi att studera hundarnas beteende både med och utan metadon i våran studie. Vi mätte kortisol och vasopressin i blodet för att kontrollera om dessa hormon påverkas av metadon. Vilket i så fall skulle kunna göra dem till olämpliga som smärtparametrar.

Material och metoder

Försöksschema

I försöket deltog tio destinationsuppfödda beaglar och beagelkorsningar (A-H). Försöket var upplagt som en "cross-over" studie, 5 hundar fick 0,4 mg metadon/kg intravenös via permanentkanyl och fem fick samma mängd med subkutan giva. Försöket upprepades efter 3 veckor de hundar som fått metadonet intravenöst fick det nu subkutant och vise versa. Vid alla försök studerades hundarnas beteende. Dessa studier kompletterades med en kontrollstudie utan metadon men under samma yttre betingelser. Av praktiska skäl var kontrollstudien av hundarna A-E någon dag före metadongiva 1, medan hundarna F-J studerades någon dag före metadongiva 2. (tabell 1)

Försöket var godkänt av Försöksdjursetiska nämnden, Uppsala.

Tabell 1 Försöksschema

Vecka	Måndag	Tisdag	Onsdag	Torsdag	Fredag
35	A kontroll	D Kontroll	G SC	A IV	C IV
	B Kontroll	E Kontroll	H SC	B SC	D IV
	C Kontroll	J SC	I SC	F IV	E IV
Vecka	Måndag	Tisdag	Onsdag	Torsdag	Fredag
38	F Kontroll	I Kontroll	B IV	E SC	H IV
	G Kontroll	J Kontroll	C SC	F SC	I IV
	H kontroll	A SC	D SC	G IV	J IV

Alla försöksdagar såg likadana ut. Hundarna utfodrades vid åttatiden och släpptes ut i rastgårdarna enligt ordinarie rutiner. Vid niotiden togs hundarna in och vägdes. Därefter lades en, alternativt två, permanentkatetrar i *vena cephalica*, en för blodprov samt eventuellt en för intravenös metadongiva. Hundarna utrustades också med tratt. I samband med kanylläggning togs nollprov för metadonanalys. Alla hundarna placerades i individuella burar (som de normalt endast är instängda i vid utfodring) ca en halvtimme före försöksstart. Tre hundar startade studien per dag. För att hinna med blodprovstagning var det en förskjutning på fyra minuter i försöksstart mellan hundarna. Första hunden fick metadon, alternativt koksalt, kl. 10.00.

Blodprover togs före och ca 10 och 30 min samt 1, 3, 6, 12, 22, 30 och 47 h efter metadongiva. Exakt tid antecknades på ett försöksprotokoll. Kontrollstudien var identisk med övriga studier förutom att koksalt injicerades i stället för metadon. Blodprov under kontrollstudien togs endast vid tre tillfällen (för att hundarna inte skulle tappas på för mycket blod) under de första sex timmarna, samt ”noll-prov” före försöksstart. Vid övriga blodprovstillfällen då riktiga prover ej togs, simulerades provtagning så att hanteringen av hundarna inte skiljde sig från övriga försöksdagar. Hundarna satt instängda i sina burar till kl. 16 alla försöksdagar med undantag för en kort rastning efter ca 4 h. Efter blodprovet vid 6 h (kl. 16.00) rastades hundarna, försöksutrustning plockades av och hundarna återgick till sina normala rutiner som startade med utfodring ca 16.30.

Provhantering

Nollprov och de första 5 proverna efter metadongivan togs med vacutainer direkt ur permanentkanyl, övriga prover togs med *butterflykanyl*. Blodet fylldes på EDTA rör som direkt efter provtagning placerades i isbad, vari de förvarades tills de centrifugerades i kylcentrifug vid 4 °C. Plasman pipetterades av och frystes därefter till -20 °C. Den plasma som var avsedd för hormonanalys förvarades i - 80 °C.

Hormonanalys

Spädningen av plasman var parallell till standardkurvan i den radioimmunologiska analysen (RIA). Mängden kortisol i plasma mättes med en Coat-a-Caount RIA (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA USA). Lägsta detektionsnivå var 1,90 nmol/l.. Variationskoefficienten inom varje analysomgång var under 10 % (11,07-1380 nmol/L). Variansen

mellan analystillfällena var <10,7 % (29,43 nmol/l), <1,7 % (284,5 nmol/l) samt <1,4 % (398,1 nmol/l). För att extrahera arginivasopressin ur plasman användes aceton (GR, Merck, Darmstadt, Germany) och petroleumbensen, därefter analyserades vasopressin med hjälp av Euro-Diagnostica AB Vasspressin RIA test. (Ideon, Malmö, Sweden). Lägsta detektionsnivå var 0,240 pmol/l. Variationskoefficienten inom varje analysomgång var under 10 % (1,570-46,08 pmol/L). Variansen mellan analystillfällena var <2,6 % (3,66 pmol/l), <1,6% (12,53 pmol/l) samt <1,1% (30,66 pmol/l).

Statistiska beräkningarna är gjorda i det kommersiella dataprogrammet SAS (SAS Institute, 2005) En upprepad variansanalys användes (Procedure MIXED) för de olika parametrarna.

Bestämning av metadon i hundplasma

Metadon och ²H₃-metadon inköptes från LGC Promochem, (Borås; Sweden). Vatten som använts till beredning av lösningar kom från en Milli-Q vattenanläggning (Millipore, Bedford, MA, USA). Alla övriga kemikalier som användes var av hög analytisk kvalitet och användes utan ytterligare rening.

Till 0.5 mL plasma tillsattes 100 µL internstandardlösning (14 ng [²H₃] metadon /100 µL metanol), 500 µL vatten, 5.0 mL hexan/2-butanol (97:3) och 100 µL 1 M natriumhydroxid. Blandningen extraherades i 20 min. Efter centrifugering överfördes den organiska fasen till ett nytt centrifugrör och indunstades vid 50°C under kvävgas. Återstoden upplöstes i 60 µL 0.1 % myrsyra i vatten. Det upplösta provet kvantifierades med LC-ESI-MS/MS. Vid LC/MS/MS analysen användes ett Surveyor LC system kopplat till en Finnigan TSQ Quantum Ultra (Thermo Electron Corporation, San José, CA, USA) masspektrometer. Separationen genomfördes med en kolonn av märket Zorbex Eclipse XAD-18 (2.1 x 50 mm, 5µM). Den mobila fasen utgjordes av 0,2% myrsyra i vatten (A) och metanol (B). Den mobila fasen pumpades med flödet 200 µL/min och förändrades genom ett gradientprogram enligt följande: 0 to 2.0 min, 15 % B; 2.0 to 5.0 min, 15 to 85% B; 5.2 to 8.0 min, 15 % B. Vid analysen analyserades proven med Selected Reaction Monitoring (SRM) och substanserna joniserades med electrospray (ESI) för positiv jonisering. Spänningen på electrosprayjonkällan var satt till 3,5 kV och sheath-gasflödet och auxiliary-gasflödet var 50, respektive 2 godtyckliga enheter. Vid analys med collision-induced dissociation (CID) användes argon som kollisionsgas med ett tryck av 1.5 mTorr. Vid SRM insamlades data för följande joner och övergångar: metadon [M+H⁺] m/z 310 → 265 and [²H₃]-metadon [M+H⁺] m/z 313 → 268. Den använda kollisionsenergien var 20V. och lägsta kvantifieringsnivå var 0.6 ng metadon/mL plasma. Standardkurvan var linjär från 0.3 till 976 ng/mL. Variationskoefficienten för metadon var 6 % (n=6) vid koncentrationsnivån 1 ng/mL plasma. (Enligt Avdelningen för kemi, SVA, professor Ulf Bondesson).

Farmakokinetisk analys

Tidsförloppet av metadonkoncentrationer i plasma för varje individ analyserades enligt en "non-compartment" - metod (Gibaldi och Perrier, 1982). Ett kommersiellt dataprogram användes för analysen (Win Nonlin 5.0.1[®] Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) Areal under kurvan (AUC) extrapolerat till oändligheten (AUC_{inf}) räknades ut med linjära trapetsmetoden. För att extrapolera AUC från tid noll till evigheten användes lutningen på den terminala fasen (λ) som beräknades från 3 h och till 47 h. Samma analys användes både för intravenös och för subkutan administration. Halveringstiden beräknades enligt formeln $t_{1/2} = \ln 2 / \lambda$. Och biotillgängligheten (F) beräknades enligt $F (\%) = 100 \times AUC_{inf,SC} / AUC_{inf,IV}$. Den observerade tiden till högsta plasmakoncentrationen (T_{max}) och den observerade högsta koncentrationen (C_{max}) efter giva utlästes ur de individuella diagrammen. Medelvärden, median och standardavvikelser (SD) beräknades med hjälp av Microsoft Excel.

Beteendestudie

Under alla försöksdagar studerades hundarnas beteende enligt ett försöksprotokoll (bilaga 1). Hundarna studerades genom att en observatör satt på en stol utanför burarna. För att vänja hundarna vid observatören gavs de en tillvänjningsperiod på ca en minut innan studien startade. Hundarna studerades i perioder om 5 minuter, efter 40 min, 1 h 10 min, 1 h 40 min, 2 h 10 min, 3 h 10 min samt efter 5 h 40 min efter försöksstart. Hundarna rastades efter observationen vid 3 h 10 min. Under de 5 minuterna hundarna studerades antecknades hundarnas beteende var 20s. Ett tidtagarur som pep var 20 sek användes för detta ändamål. För definition av beteendena, se tabell 2. Samtidigt gjordes också en frekvensstudie på beteendena gnälla, svälja och munslick (dvs antal slickningar runt nosen).

Tabell 2 Definition av beteenden

Beteende		Definition av beteende
Gå	stadigt	Går i lugn takt med alla benen i naturlig ordningsföljd
	vingligt nosar	Går med benen i onaturlig ordningsföljd Riktar nosen mot något och drar in luft
stå	stadigt	Står med alla fyra benen jämt belastade
	vingligt	Står med ojämn belastning av benen
	aktivt	Står stadigt, roterar/ horisontell rörelse med huvud
	hängande huvud	Står stadigt, huvudet sjunker neråt-framåt
sitta	stadigt	Sitter med raka framben och bakben under sig eller åt sidan
	aktivt	Sitter stadigt, roterar/ horisontell rörelse med huvud
	hängande huvud	Sitter huvud sjunker neråt-framåt
ligga	stadigt	Huvudet upp, framben framåt och baktassar under sig
	aktivt	Ligger stadigt, roterar/ horisontell rörelse med huvud
	hängande huvud	Huvudet sjunker neråt-framåt
	huvud på tassar	Huvud på tassar, framben raka, bakben under sig
	"kringla"	Ligger i cirkel med huvud mot svansen
	bakben åt sidan på sidan	Huvud på tassar, bakben har glidit åt sidan Platt på sidan
blunda		Slutna ögon i vilken position som helst
hässja		Tungan hänger ut, kraftig andhämtning
hulka		Sammandragningar av diafragma utan uppstötning
salivera		Drägel i mungipan
ögonkontakt		Ser mig/observatören i ögonen
skaka		Muskeldarrningar
slicka, bita		Slickar/biter intensivt på dörrgallret

Statistik

Vid den statistiska beräkningen av beteendena användes det kommersiella dataprogrammet MINITAB. Beräkningarna gjordes enligt Wilcoxon, en icke parametrisk metod. Metoden jämför medianen i kontrollen med alla värden för den grupp man testar och beräknar om en ökning eller minskning är signifikant. Denna statistiska metod kan inte användas om medianhunden inte utför beteendet. För att undvika att medianen blir noll har medelvärden för varje hunds beteende över hela dagen använts. Vid de statistiska

beräkningarna ingår även de hundar som inte uttrycker ett beteende. Medelvärden, median och standardavvikelse (SD) beräknades med hjälp av Microsoft Excel. Vid beräkningarna har hundarna delats in i olika grupper.

Kontroll: (K) bygger på studier av hundarna opåverkade av metadon, hälften av hundarna kontrollerade v 35 och hälften v 38.

Metadon: (M) alla hundar som fått metadon IV eller SC v 35 och 38

IV: de hundar som fått intravenöst v 35 och 38, 9 hundar (hund B saknas)

SC: de hundar som fått subkutant v 35 och 38, 9-11 hundar beroende på om hund B räknas med eller inte.

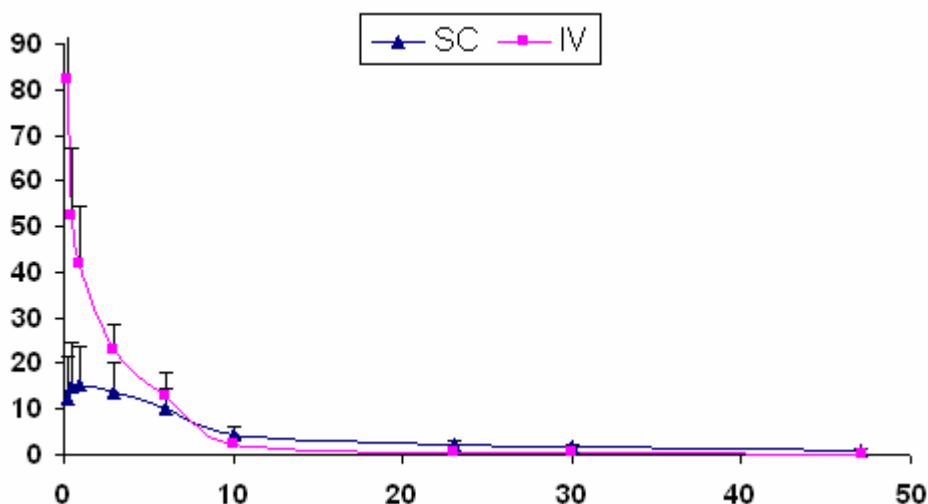
Resultat

Farmakokinetik

Tidsförloppet av metadonkoncentrationen i plasma visas i figur 1.

Den farmakokinetiska analysen visade att metadon efter intravenös giva på 0,4 mg/kg hade en halveringstid på 3,9 h \pm 1,0 h (medel \pm SD). (tabell 3). Efter subkutan injektion med samma dos var halveringstiden längre och varierade mer, den var 10,7 h \pm 4,3 h (medel \pm SD). Efter subkutan giva uppnåddes en maximal koncentration (C_{max}) i blodet på 23,9 \pm 14,4 μ g/l (medel \pm SD) ca 1,5 h efter injektion. Biotillgängligheten efter SC administration var ca 80 % \pm 22 % (medel \pm SD) (tabell 4).

Av misstag fick hund B metadon SC vid båda administrationstillfällena. Därför saknas hund B vid beräkningar av farmakokinetiken efter intravenös infusion. Vid SC beräkningar har ett medeltal av B:s observationer använts.



Figur 1. Y-axel anger medelkoncentrationen av metadon i plasma (ng/ml) efter SC (n=10) och IV (n=9) administration, 0,4 mg/kg till hund. X-axeln anger tid i timmar.

Tabell 3. Farmakokinetiska data efter intravenös giva av metadon(0,4 mg/kg) till hund (n=9)

Hund	T1/2 h	Cl L/min/kg	V _{d,ss} L/kg	AUC	MRT min
A	3,4	0,0330	9,8	12085,9	238,0
C	4,6	0,0169	6,7	23682,4	261,8
D	5,0	0,0340	14,7	11734,7	325,6
E	2,8	0,0363	8,9	11022,0	187,9
F	2,3	0,0331	6,6	12115,3	186,3
G	3,0	0,0208	5,4	19201,1	209,1
H	4,0	0,0218	7,6	18306,7	251,3
I	5,1	0,0208	9,2	19146,7	332,3
J	4,8	0,0341	14,3	11606,5	261,6
medel	3,9	0,0279	9,2	15433,5	250,4
SD	1,0	0,0076	3,3	4667,5	53,0
median	4,0	0,0330	8,9	12115,3	251,3
lägsta	2,3	0,0169	5,4	11022,0	186,3
högsta	5,1	0,0363	14,7	23682,4	332,3

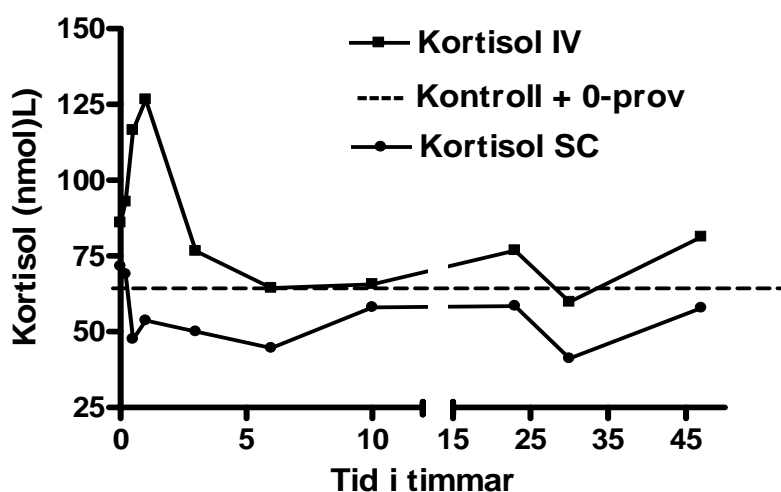
Tabell 4. Farmakokinetiska data efter subkutan giva av metadon(0,4 mg/kg) till hund (n=10)) T/2 = terminala halveringstiden, Tmax = tid till maximal blodkonsentration. V_{d,ss} = distributionsvolym vid steady state, AUC= area underkurvan ,MRT = mean residual time, F =biotillgänglighet

Hund	T/2 h	Tmax h	Cmax ug/L	V _{d,ss} L/kg	AUC	MRT min	F %
A	15,0	0,17	55,3	53,29	9780,8	1274,2	81%
B	10,9	1,66	15,8	27,915	13674	1061,35	NA
C	6,7	1,05	33,0	12,02	19385,1	541,8	82%
D	10,5	1,00	12,1	33,51	10578,0	880,8	90%
E	7,0	1,00	19,6	18,28	13146,6	583,0	119%
F	5,7	0,17	30,7	23,72	8326,2	403,4	69%
G	8,3	1,00	22,2	27,52	10350,8	585,6	54%
H	19,2	3,05	6,9	73,55	8511,3	1804,3	46%
I	14,0	3,03	11,0	34,64	13866,6	1247,5	72%
J	9,6	0,50	32,3	29,28	11323,2	698,3	98%
medel	10,7	1,26	23,9	33,4	11894,2	908,0	79%
SD	4,3	1,04	14,4	17,9	3296,8	437,1	22%
median	10,0	1,00	20,9	28,6	10950,6	789,6	81%
lägsta	5,7	0,17	6,9	12,0	8326,2	403,4	46%
högsta	19,2	3,05	55,3	73,6	19385,1	1804,3	119%

Hormoner

Kortisol

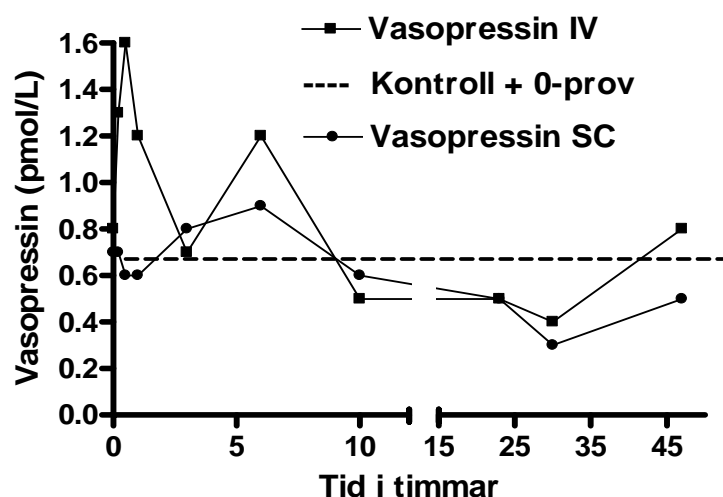
Plasmakoncentrationerna av kortisol var signifikant högre efter IV giva än efter SC vid 10 och 30 min. ($P < 0,000$, $P < 0,000$). Signifikant höjning av kortisolvärdet jämfört med nollprovet kunde endast ses vid 1 h ($P = 0,010$). En signifikant sänkning av kortisolvärden efter SC giva jämfört med nollprovet, kunde ses efter 30 min 1, 6 samt 30 timmar ($P = 0,021$, $P = 0,031$, $P = 0,012$, $P = 0,007$, för respektive värde), (Figur 2).



Figur 2 Medelkoncentrationer av kortisol i plasma efter SC ($n=10$) och IV ($n=9$) administration av metadon, 0,4 mg/kg, till hund. Den streckade linjen utgör medelvärdet av alla blodprov innan metadongiva och blodprover från kontrollstudien ($n=10$) tagna vid tre tillfällen under de första 6 timmarna. Observera att X axeln är bruten.

Vasopressin

Vasopressinkoncentrationen i plasma var signifikant högre vid IV administration än vid SC 30 min efter metadongiva (P 0,002). Vid samma tidpunkt var det en signifikant ökning av vasopressinkoncentrationen efter IV giva jämfört med koncentrationen i plasma före metadongivan (p=0,007). Maximala vasopressinkoncentrationen i plasma inträffade vid 30 min efter intravenös administration. (Figur 3).



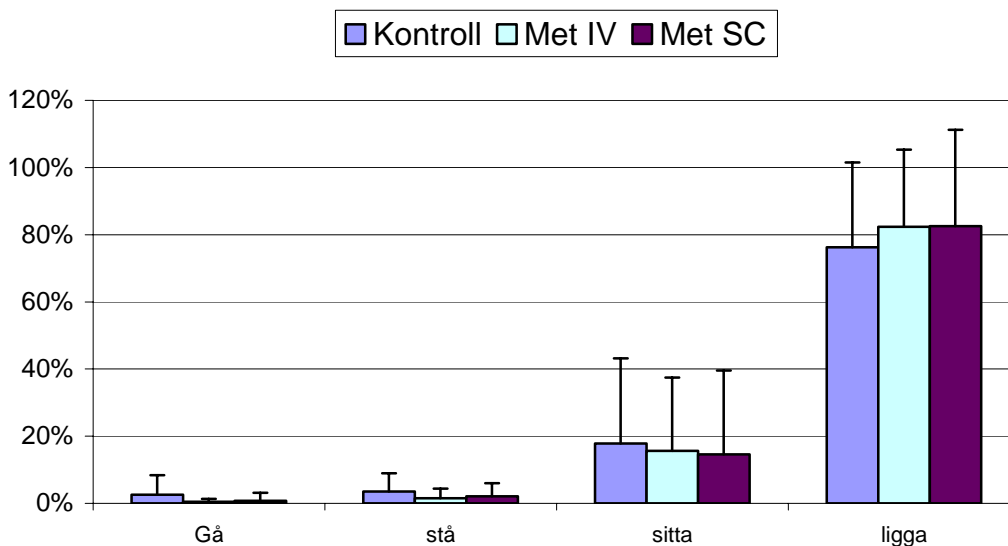
Figur 3. Medelkoncentrationer av vasopressin i plasma efter SC (n=10) och IV (n=9) administration av metadon, 0,4 mg/kg, till hund. Den streckade linjen utgör medelvärde av alla blodprov innan metadongiva och blodprover från kontrollstudien (n=10). Observera att X-axeln är bruten.

Beteendestudie

Före det att observationerna startades (40 min efter metadongivan) gjordes den subjektiva iakttagelsen, att metadonpåverkade hundar (i synnerhet de som fått giva IV), låg ner i stor utsträckning. Många låg platt på sidan, de var avslappnade i muskulaturen och orkade ofta inte sätta sig upp vid de första blodprovtagningarna. Nedsatta placeringsreflexer noteras hos en individ. Vid de statistiska beräkningarna efter SC giva har hund B:s resultat från både vid 35 och 38 räknats med. Efter IV giva saknas värden för hund B.

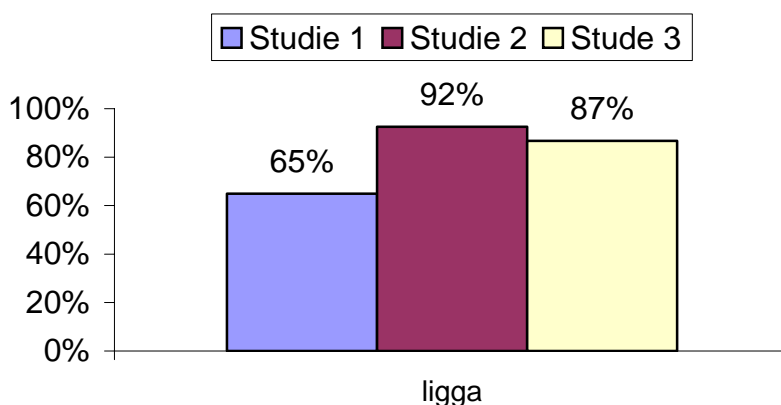
Ligga

Beteendestudierna visade att hundarna låg i genomsnitt ca 80 % av tiden genom hela studien. Hundarna låg signifikant mer efter metadongiva (82 %) jämfört med kontrollen (78 %)(P=0,045) (Figur 4). Övriga positioner (gå, stå och sitta) uttryckte hundarna i sådan liten utsträckning att det inte närmare analyserats.



Figur 4: Procent av tiden som hundarna, går, står, sitter eller ligger efter administration av metadon 0,4 mg/kg, staplarna anger medelvärden med standardavvikelse Kontroll, (n=10) SC (n=11), IV (N=9)

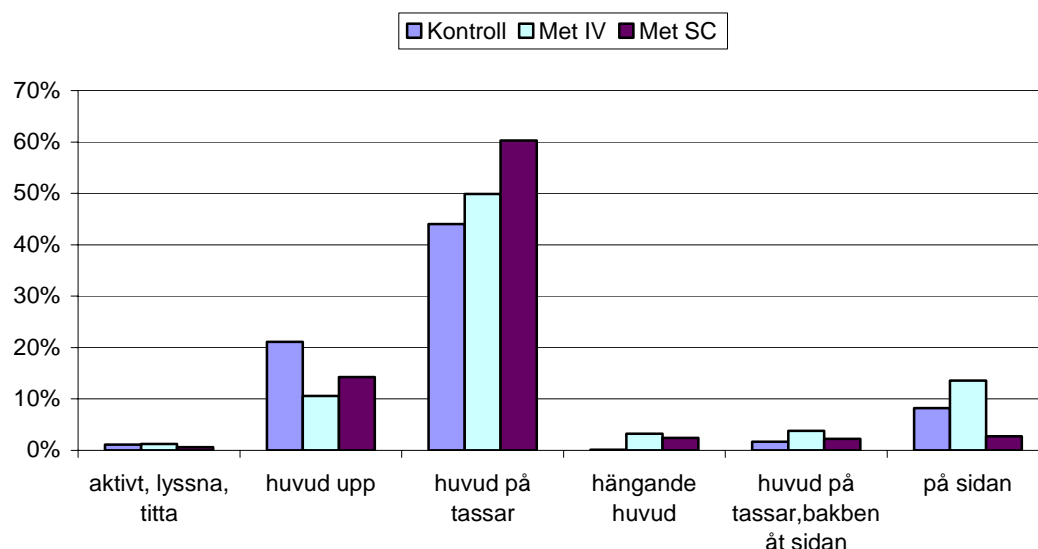
Första gången hundarna genomgick försöket låg de i medeltal 65 % medan andra gången låg de 92 % av tiden (hälften av hundarna hade fått metadon i båda grupperna pga av försöksupplägget, se tabell 1) Tredje gången hundarna genomgick försöket (alla hade fått metadon) låg de 87 % av tiden (figur 5). Hundarna låg i medeltal lika länge efter IV (82,3 %) som efter SC giva (82,5 %).



Figur 5: Procent av tiden hundarna låg 1:a, 2:a och 3:e gången de genomgick försöket. I försöksomgång 1 och 2 var 50 % av hundarna metadonpåverkade, i studie 3 var 100 % metadonpåverkade.

Ligpositioner

Huvud på tassar var den vanligaste liggpositionen alla kategorier. Hundarna i kontrollomgången låg med huvud på tassar i 44 % och efter tillförsel av metadon, IV och SC, låg hundarna på det sättet i 50 % respektive 60 % av tiden. Dessa skillnader var inte signifikanta i förhållande till kontrollen. Vi fann att hundarna låg platt på sidan mer efter IV än efter SC giva, 14 % respektive 3 %, men inte heller detta var signifikant i jämförelse med kontrollomgången då hundarna låg på sidan 8 % av tiden (se figur 6).



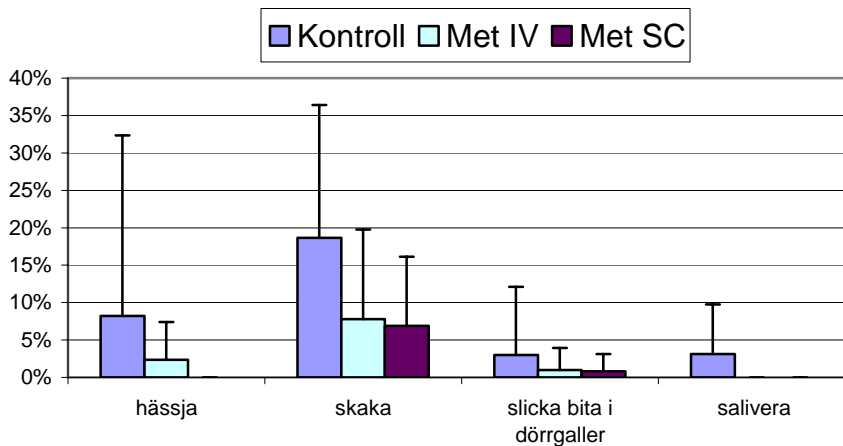
Figur 6: Specificering av beteendet ligga. Positioner anges i procent av tiden de uttrycks. Kontroll(n=10) IV (n=9) och SC (n=11)

Ögon

Hundarna uppvisade inga signifikanta skillnader i hur många procent de hade ögonen slutna eller i hur mycket tid de hade ögonkontakt med observatören i kontrollomgången jämfört med efter tillförsel av metadon IV och SC.

Övriga beteenden

Beteendena hässja, slicka, bita och salivera samt skaka minskade eller försvann efter metadontillförsel och det var ingen skillnad mellan IV och SC giva. Alla ovan nämnda beteenden uttrycktes endast av 2 hundar per beteende (utom skaka som uttrycktes av 5 hundar) Hund D uttrycker alla nämnda beteenden, medan övriga individer varierar från beteende till beteende. Statistiska beräkningar av dessa beteenden kunde ej genomföras p g a för få hundar som uttryckte dem. Beteendet skaka, däremot, uttryckte hundarna i kontrollstudien 19 % av tiden, och ca 7 % av tiden efter metadongiva (P=0,013).

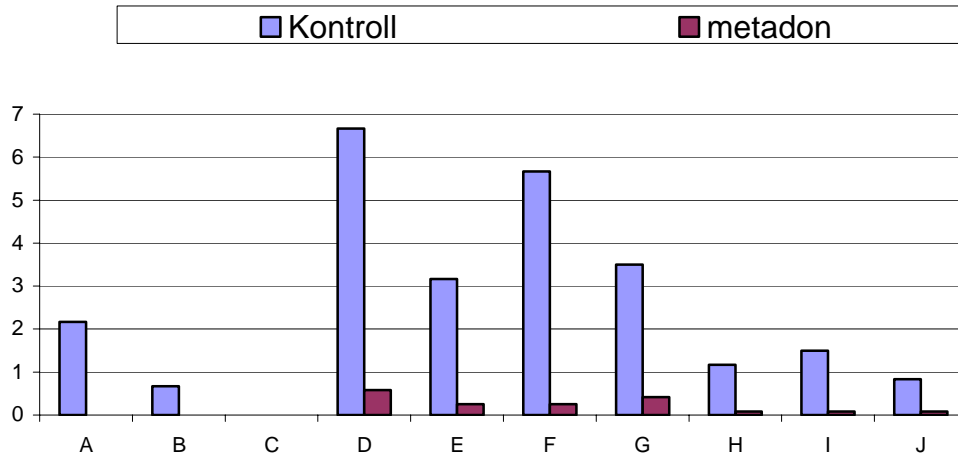


Figur 8 Beteenden i procent av tiden de uttrycks Kontroll(n=10) SC (n=11) IV (n=9)

Frekvensstudier

Munslick

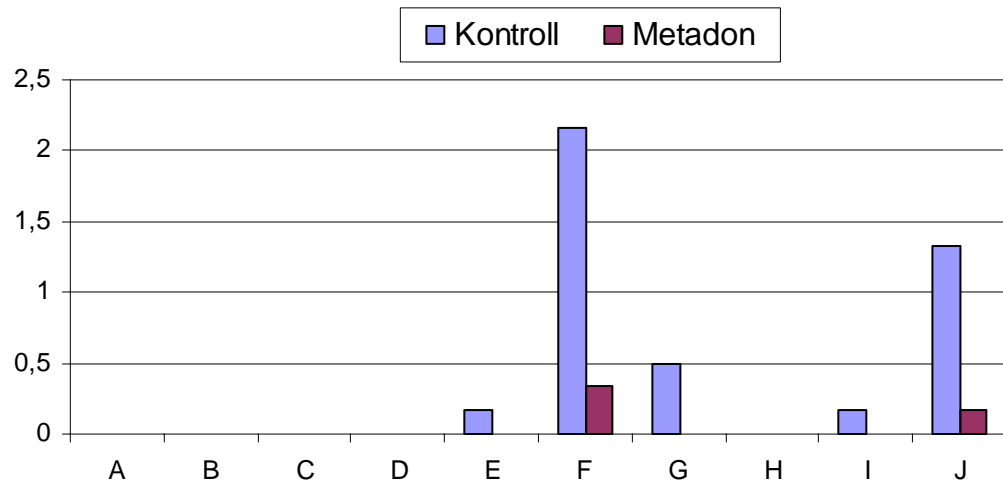
Vid frekvensstudie av antal munslick fann vi en signifikant minskning ($P < 0,001$) av beteendet hos de hundar som fått metadon jämfört med kontrollen. Minskningen förekom hos alla de 9 hundar som uttryckte beteendet.



Figur 9 Medeltal munslick/5 minuter hos hundarna A-J i kontrollen samt efter metadongiva (studierna efter SC och IV är hopslagna)

Svälja

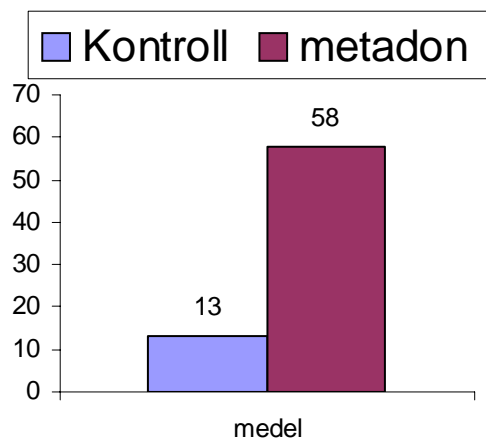
Beteendet svälja uppvisade ett liknande mönster som för munslick, men det uttrycktes dock inte lika frekvent bland hundarna. Av de 5 hundar som svalde i kontrollen minskade eller försvann beteendet hos alla efter metadongiva. Signifikant minskning av beteendet kunde visas efter metadon jämfört med kontrollen ($P=0,038$).



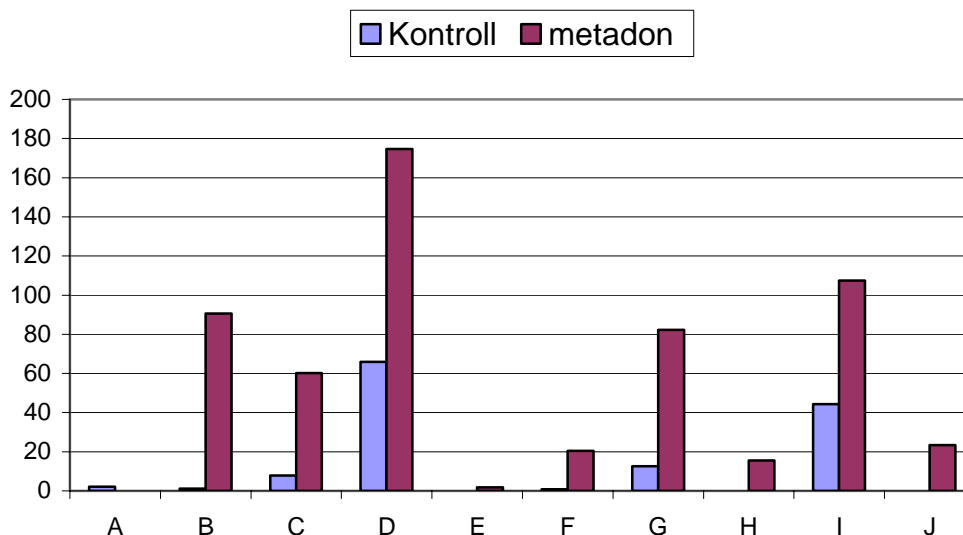
Figur 10 Medeltal frekvens sväljningar/5 minuter hos hundarna A-J (studierna efter SC och IV är hopslagna).

Gnäll

Frekvensstudien av gnäll visade att hundarna gnydde 4,5 gånger mer med metadon än utan ($P < 0,001$). Figurerna 11 och 12



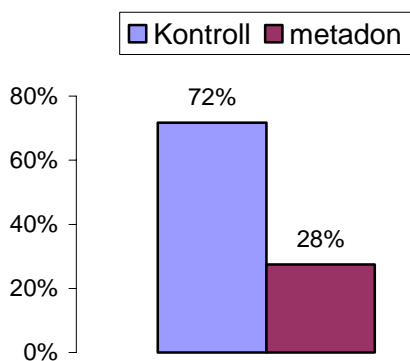
Figur 11 Medelantal Gnäll/5minuter hos hundarna A-J.



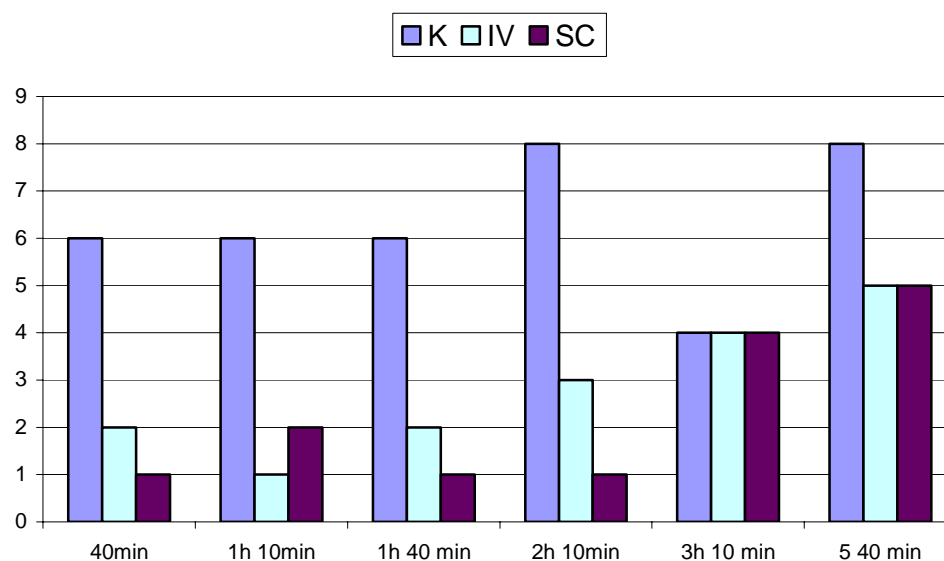
Figur 12 Medeltal frekvens gnäll/5 minuter hos hundarna A-J

Obehag

Beteendena hässja, salivera, slicka och bita, skaka samt munslick redovisas här tillsammans som obehag. Vi har kontrollerat om hundarna uttryckte något av ovanstående beteenden någon gång vid varje enskild beteendestudie (6 st/dag). Antalet hundar som uttryckte dessa beteenden minskade 2,5gr efter metadongiva. Figurerna 13 och 14.



Figur 13 Procent av tiden hundarna uttrycker "obehag" dvs. något av beteendena hässja, skaka, salivera, slicka och bita, svälja eller munslick Totalt antal hundar 9 st. (Hund B ej medräknad)



Figur 14 Antal hundar av totalt 9 st (Hund B ej medräknad) som uttryckte "obehag" dvs. något av beteendena hässja, skaka, salivera, slicka och bita, svälja eller munslick vid varje beteendestudie. Hund A uttryckte inget av ovanstående beteenden.

Diskussion

Framakokinetik

Hos människa har man visat att metadons farmakokinetik skiljer sig kraftigt åt på individnivå. Därför rekommenderas i FASS, 2006, att dos och itereringsintervall individanpassas efter patientens smärtlindringsbehov. I vår studie såg man efter SC administrering också en relativt stor individuell variation i halveringstider (6-19 h). Halveringstiden var dock kortare än hos människa (15-57 h) (FASS 2006) och varierade inte riktigt lika mycket. Halveringstiden efter IV giva var kortare, ca 4 h (2,3-5,1 h), än efter SC giva och överensstämmer med tidigare undersökningar (Schlitt *et al.*, 1978, Stanley *et al.*, 1980, Garret *et al.*, 1985, Schmidt *et al.*, 1994, Kukanich *et al.*, 2005). Den långsamma absorptionen efter SC administrering är sannolikt förklaringen till den längre halveringstiden jämfört med IV administrering. Biotillgängligheten efter SC administration var omkring 80 % och varierade mellan 46 % upp till 119 %. Hos människa kan individvariationerna i kinetik till en del förklaras med att metadons plasma-proteinbindning i första hand sker till akutfasproteinet AAG. Dess plasmakoncentration kan variera mycket. Den ökar till exempel när kroppen befinner sig under stress, vilket leder till att den fria fraktionen plasmametadon minskar hos dessa individer (Garrido 1999). Fler studier behövs för att visa om liknande mekanismer finns hos hund.

Skillnaderna i halveringstider och biotillgänglighet mellan individer efter SC administrering kan bero på var läkemedlet deponerats, dvs SC eller i det subkutana fettet. Fettvävnad har sämre genomblödning vilket ger

långsammare absorption och därmed längre halveringstid och lägre biotillgänglighet.

Kliniskt kan man använda skillnaden i farmakokinetik mellan de olika administrationssätten. Lämpligen används IV initialt för att snabbt komma upp i blodkoncentrationer i terapeutisk nivå om snabbt anslag önskas. Därefter utnyttjas den längre halveringstiden vid SC administrering för att få längre itereringsintervall. Praktiskt är det dessutom lättare att ge SC då man inte behöver någon permanentkanyl. Dock kan skillnaderna i halveringstider mellan individer bli problematisk och man bör överväga behovsanpassad dosering. Det saknas fortfarande studier på IM administrering av metadon till hund. Hos get uppges att metadon ha en halveringstid på 1,38 h och når C_{max} 15 min efter IM giva (Kock *et al* 1994). Troligtvis är även absorptionsfasen av metadon hos hund snabb efter IM och farmakokinetiken liknar den för IV. Ytterligare studier behövs för att bekräfta detta. Hos människa ackumuleras metadon vid upprepad administrering pga dess långa halveringstid (FASS 2006). Vår studie visade att halveringstiden var längre för SC administrering än för IV men att den var kortare än hos människa. För att ta reda på om ackumulering även sker efter SC administrering av metadon till hund behövs det ytterligare studier med upprepade doseringar av läkemedlet.

Beteendestudie

Tillvänjningseffekt

Beteendestudien utfördes i hundarnas normala miljö, men de var inte vana att vara instängda i mindre utrymmen. Det förutsågs att hundarna skulle bli stressade av försöket men det var inte praktiskt möjligt att vänja hundarna före försöksstart. Att det finns en tillvänjningseffekt i försöket kan inte uteslutas. Första gången hundarna genomgick försöket låg de i medeltal 65 % av tiden medan andra gången låg de hela 92 % av tiden. Lika många hade fått metadon i båda grupperna och skillnaden kan inte heller förklaras av olika antal IV/SC då de båda grupperna låg lika mycket i studien. Den eventuella tillvänjningseffekten skulle kunna förklaras med att andra gången hundarna genomgick försöket saknade de förväntan på aktivitet, och låg därför mer. Tredje gången hundarna genomgår försöket ligger de 87 % av tiden, och då har alla hundar fått metadon. Varför hundarna ligger mindre gång tre än gång två kan inte förklaras.

Sedering

Hundarna förväntades bli sederade av metadon (Kukanich *et al* 2005) och med doser över 1,0 mg/kg kan kirurgisk anestesi uppnås. (Stanley *et al* 1980) Sedering borde medföra förändringar i liggbeteende vilket bekräftades av en signifikant ökning (med reservation för påverkan av ev tillvänjningseffekt) av beteendet ligga efter metadongiva. Denna ökning var dock inte lika stor som förväntat. En förklaring till detta kan vara att en uttråkad hund utan stimuli uppträder mycket likt en lätt sederad hund varför skillnaden mellan grupperna blev förhållandevis liten. Men den viktigaste

orsaken är sannolikt att beteendestudien startade först 40 min efter metadongiva då den kraftigaste läkemedelseffekten redan var över. Om registrering av beteendena startat tidigare hade vi troligen fått en större ökning av beteendet ligga men även fått en ökning av liggbeteenden hängande huvud, huvud på tassar med bakben åt sidan samt platt på sidan (*figur 6*) dvs. beteenden som skulle kunna beskriva en sederad hund. Slutsatsen är alltså att metadon har en sederande effekt men att den till stor del har försvunnit redan efter 40 minuter.

Illamående

Det är vanligt att se kräkningar hos hundar som får morfin om de inte är smärtpåverkade, men det är ovanligt vid postoperativ smärtlindring (Pascoe 2000). Kräkningar tycks dock inte vara någon biverkning av metadon till skillnad från många andra opioider (Kukanich *et al* 2005). Ingen hund visade heller några tecken på illamående i vår studie, dvs ingen hulkade eller kräktes efter metadongiva. Övriga beteenden salivera, svälja och munslick, (som tagits med i studien som potentiella tecken på illamående), tvärt om minskade eller försvann efter metadongiva.

Gnäll

Gnäll är ett cykliskt beteende, dvs hundarna gnäller en stund intensivt varpå gnället avtar eller försvinner för att en stund senare åter ta fart igen. Vi studerade hundarna endast i 30 min/dag uppdelat på 6 x 5 minuter. Därför kan det för varje individ skilja ganska mycket i frekvens gnäll mellan de olika tillfällena i fokalstudien, beroende på om man studerat hundarna under en period då de gnäller mycket eller inte. Vid jämförelse av det totala antalet gnäll för alla tio hundarna, gnällde hundarna 4,5 gånger mer efter metadongiva än utan. Observera dock att inte alla hundar gnäller mycket vid metadonpåverkan. Hund A och E gnällde tex inte alls eller ytterst lite både med och utan metadon. Benägenheten att gnälla är alltså individuell, och det kan inte uteslutas att en redan ”gnällig” hund gnäller mer efter metadongiva. Det är svårt att förklara varför gnällandet ökar. Gnäll skulle kunna vara ett tecken på obehag, men mönstret skiljer sig helt från övriga obehagsrelaterade beteenden i studien. I det flesta studier slås gnäll och andra läten ihop till vokalisering. I en studie av Beerda *et al.*, (1998) kunde inte vokalisering kopplas till akut stress hos hund. Oavsett anledning till gnällandet är vetskapen att metadonpåverkade hundar gnäller mycket, viktigt vid smärtutvärdering. En hund som ligger och gnyr, kan alltså ha ont, ha tråkigt, vilja komma ut ur buren eller vara påverkad av metadon!

Obehag – Stress

När hundar akut utsätts för stressorer, av både fysisk- och psykisk natur uttrycker hundar beteenden som hässjande, muskelskakningar, salivering, gäspningar, ”munbetenden” (bl.a. munslick och sväljningar), trampande, hopsjunken position samt stereotypa beteenden. (Beerda *et al.*, 1997; Beerda *et al.*, 1998) I en studie där hundarna observerats instängda i burar inför operation, fastslogs det att hundar kan känna stress vid sjukhusvistelse. I studien sågs hässjande och munslick hos nästan alla individer och även muskelskakningar registrerades hos några individer. (Väisänen *et al.*, 2005) Rädsla kan utlösa muskelskakningar, dessa hundar hade en högre mängd

adrenalin jämfört med noradrenalin (Varrier och Dickenson 1991). Det är sannolikt att hundarna i vår studie visade stress beroende på försökssituationen. Alla beteenden som kan betraktas som stressrelaterade minskade efter metadongiva. Till dessa beteenden hör fokalstudierna av hässja, slicka och bita i dörrgaller, skaka och salivera samt frekvensstudien av svälja och munslick. Många av de stressrelaterade beteendena i vår studie uttrycktes av så få hundar att det inte gick att göra några säkra statistiska beräkningar. Vi kunde dock visa en signifikant minskning av beteendena munslick, svälja och skaka. Eftersom alla stressrelaterade beteenden inte uttrycktes av alla hundar kontrollerades om hundarna visade något av de stressrelaterade beteendena vid varje enskild studie. Det visade sig att vid den första beteendestudien efter 40 min hade antal hundar som uttrycker stressrelaterade beteenden minskat med två tredjedelar. Över hela dagen minskade tiden hundarna uttryckte stressrelaterade beteenden 2,5 ggr efter metadongiva jämfört med under kontrollstudien.

Kortisol

Vi fann en sänkning av kortisolvärdena efter SC giva jämfört med nollprover (prov tagna före metadongiva). I en studie där rädsla provocerades genom pistolskott hos 14 hundar mättes kortisol i plasma (samma metod och laboratorium som i vår undersökning). Före provokation låg kortisolvärdena runt 40 nmol/l, och vid rädsle-provokationerna steg kortisolvärdena till mellan 120- och 160 nmol/l hos skotträdda hundar. (Hydbring-Sandberg *et al.*, 2004) Medelvärdet av kontrollprover och nollprover i vår studie låg nära 70 nmol/l och efter SC administrering låg kortisolvärdena kring 50 nmol/l. Detta innebär att kortisolvärdena sjönk från en hög nivå ner mot en mer normal nivå efter SC administrering. Detta stöder teorin att hundarna var stressade under försöket och att stressen minskade efter metadongiva, då kortisol kan användas som stressindikator (Minton, 1994; Molony & Kent, 1997). Efter IV giva ökade däremot kortisolnivån signifikant efter 60 min jämfört med nollprov. Nivån på ca 120 nmol/l liknar de skotträdda hundarnas värden. Vi såg inte mer stress/obehagsrelaterade beteenden efter IV än SC giva varför den ökade kortisolfrisättningen troligtvis är en direkt effekt av läkemedlet vid höga koncentrationer. Initialt efter IV giva var koncentrationerna i plasma avsevärt högre än efter SC giva. En höjning av plasmakortisolkoncentrationer efter administrering av opioider har tidigare visats hos andra arter såsom råttor (Guaza et al 1979) mus, marsvin (Pechnick 1993) och katt (Guaza et al 1979).

Vasopressin

Enligt (Hellebreckers 1989) leder metadondoser över 0,5 mg/kg, till frisättning av vasopressin. Våra resultat stämmer ganska väl med detta. Vi såg en liten men ändå signifikant höjning av vasopressin efter 30 min, jämfört med nollproven, men endast efter IV administrering. Vid SC administrering såg vi ingen ändring i plasmakoncentration. Frisättning av vasopressin skedde alltså bara vid höga plasmakoncentrationer av metadon. Enligt Minton (1994) deltar både *cortico-releasing-hormone* och

vasopressin i regleringen av ACTH vilket i sin tur stimulerar till kortisolfrisättning i binjuren. Det är oklart om central frisättning av vasopressin till hypofysens framlob sker i samtidigt som den axonala transporten till bakloben och frisättning därifrån. Om så är fallet kan kortisolhöjningen som noterades 60 min efter metadongiva kan således även till en del förklaras som en effekt av vasopressinökningen.

Slutsats

Sammanfattningsvis är subkutan administrering att föredra framför intravenös då man kan utnyttja den längre halveringstiden för att få längre dosintervall. Det finns individvariationer i farmakokinetik vilket skulle kunna motivera en behovsanpassad dosering. Metadon gav en sederande effekt, minskade stressen och gav inte upphov till illamående. I studien framkom att kortisol, vasopressin samt gnäll troligtvis är olämpliga parametrar i smärtutvärdering efter metadongiva.

Tack

Tack till Djurskyddsmyndigheten som har bidragit med ekonomiskt stöd till undersökningen.

Litteraturförteckning

- Beerda , Schilder , van Hoff ,Vries, Mol, (1997) Manifestation of Chronic and acute stress in dogs. *Appl Animal Behav Sci* 52, 307-319
- Beerda , Schilder , van Hoff ,Vries, Mol, (1998) Behavioural responses to different types of stimuli in dogs *Appl Animal Behav Sci* 58, 365-381
- Dobromylskij P: The pharmacokinetics of methadone during the preoperative period. *Vet Anaesth.* 20:45, 1993
- Garrett ER, Derendorf H, Mattha AG. Pharmacokinetics of morphine and its surrogates. VII: High-performance liquid chromatographic analyses and pharmacokinetics of methadone and its derived metabolites in dogs. *J Pharm Sci.* 1985 Nov;74(11):1203-14.
- Garrido MJ, Troconiz IF. Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1999 Oct;42(2):61-6. Review
- Gibaldi, M. & Perrier, D. (1982). Noncompartmental analysis based on statistical moment theory. In *Pharmacokinetics*, 2nd edn. Ed Swarbrick J. pp. 409–417. Marcel Dekker, New York.
- Guaza C, Torrellas A, Borrell J, Borrell S Effects of morphine upon the pituitary-adrenal system and adrenal catecholamines: a comparative study in cats and rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1979 Jul;11(1):57-63
- Hansen BD. Assessment of pain in dogs: veterinary clinical studies. *ILAR J.* 2003;44(3):197-205. Review.
- Hellebrekers LJ, Mol JA, Van den Brom WE, Van Wimersma Greidanus TB. (1987) Effect of methadone on plasma arginine vasopressin level and urine production in conscious dogs. *Eur J Pharmacol.* Apr 29;136(3):279-86
- Hellebrekers, L.J., van den Brom, W.E. & Mol, J.A. (1989). Plasma arginine vasopressin response to intravenous methadone and naloxone in conscious dogs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 248, 329–333.
- Kock, Thompson, Vulliet, Brooks, Pharmacokinetic properties of methadone hydrochloride after single intramuscular administration in adult dairy goats. *Lab Anim Sci*, 1994 oct;44(5):503-7
- Kukanich B, Lascelles BD, Aman AM, Mealey KL, Papich MG. Related Articles, The effects of inhibiting cytochrome P450 3A, p-glycoprotein, and gastric acid secretion on the oral bioavailability of methadone in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2005 Oct;28(5):461-6.
- Leibetseder EN, Mosing M, Jones RS..A comparison of extradural and intravenous methadone on intraoperative isoflurane and postoperative analgesia requirements in dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2006 Mar;33(2):128-36
- Minton JE. Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *J Anim Sci.* 1994 Jul;72(7):1891-8. Review
- Molony V, Kent JE. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci.* 1997 Jan;75(1):266-72.
- Pascoe (2000) Opioid analgesic Saunders, *The veterinary clinics of North America Small Animal Practice: Management of pain.* 30:4 s757- 769 Philadelphia
- Pechnick RN.Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1993;33:353-82. Review.
- SAS Institute 2005 SAS User's Guide Statistics, version 9.1. Cary NC, USA: SAS institute inc.
- Schlitt SC, Schroeter LM, Wilson JE, Olsen GD. Methadone-induced respiratory depression in the dog: comparison of steady-state and rebreathing techniques and

correlation with serum drug concentration. *J Pharmacol Exp Ther.* 1978 Oct;207(1):109-22

Schmidt N, Brune K, Williams KM, Geisslinger G. Stereoselective pharmacokinetics of methadone in beagle dogs. *Chirality.* 1994;6(6):492-5.

Stanley TH, Liu WS, Webster LR, Johansen RK Haemodynamic effects of intravenous methadone anaesthesia in dogs. *Can Anaesth Soc J.* 1980 Jan;27(1):52-7.

Vaisanen MA, Valros AE, Hakaoja E, Raekallio MR, Vainio OM Pre-operative stress in dogs - a preliminary investigation of behavior and heart rate variability in healthy hospitalized dogs *Vet Anaesth Analg.* 2005 May;32(3):158-67.

Verrier RL, Dickerson LW. *Circulation.* Autonomic nervous system and coronary blood flow changes related to emotional activation and sleep 1991 Apr;83(4 Suppl):II81-9.

Bilaga: försöksprotokoll

Hundarna studerades i perioder om fem minuter, efter 40min, 1h 10min, 1h 40 min, 2h 10min, 3h 10 min samt efter 5h 40 min efter försöksstart. Under de fem minuterna antecknades hundarnas beteende var 20 s. Ett tidtagarur som markerade var 20 s användes för detta ändamål. Samtidigt gjordes också en frekvensstudie där varje beteende markerades med ett sträck i protokollet

hund ID	Datum:	Klockslag:														
Beteendekategori		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gå	Går stadigt															
	Går vingligt															
	Oroligt gående															
	går och nosar															
Klättra/hoppa	mot vägg/dörr															
gräva/krafsa																
plocka av tratt																
Stå	Stadigt															
	Vingligt															
	aktivt															
	hängande huvud															
Sitter	stadigt															
	aktivt															
	hängande huvud															
Ligga	stadigt															
	aktivt															
	hängande huvud															
	huvud på tassar															
	"kringla"															
	bakben åt sidan															
	på sidan															
Blunda																
hässa																
hulka																
salivera																
Dricka																
svansföring	hög															
	mellan benen															
	viftande															
ögonkontakt																
skaka																
slicka/bita																

"Skall"	yl	gnäll	morning	kräkning	Ramla	kla	munslick	svälja

observatör: