

# Fysiologiska förändringar vid administration av butorfanol till friska getter

Physiological changes in healthy goats when administered butorphanol

*Felicia Andersson*



Foto: Felicia Andersson



# Fysiologiska förändringar vid administration av butorfanol till friska getter

Physiological changes in healthy goats when administered butorphanol

*Felicia Andersson*

**Handledare:** Eva Sandberg, SLU, Sveriges Lantbruksuniversitet,  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

**Examinator:** Kristina Dahlborn, SLU, Sveriges Lantbruksuniversitet,  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad E-nivå

**Kurstitel:** Examensarbete i Husdjursvetenskap

**Kurskod:** EX0560

**Program/utbildning:** Husdjursagronom

**Utgivningsort:** Uppsala

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Butorfanol, Fysiologi, Get, Hematokrit, Kortisol, Plasmaprotein, Vasopressin



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi



# Innehållsförteckning

Abstract	1
Sammanfattning	2
Inledning	3
Bakgrund	4
Smärta	4
Stress och fysiologiska parametrar som mätts i denna studie	4
Material och metoder	7
Pilotförsök	7
Huvudförsök	7
Djuren	8
Försöksupplägg	8
Analysmetoder	10
Statistik	11
Resultat	12
Hematokrit	12
Plasmaprotein	13
Kortisol	14
Vasopressin	15
Diskussion	16
Slutsats	17
Referenser	18
Bilagor	20
Bilaga 1	20
Bilaga 2	24
Bilaga 3	28
Bilaga 4	32



## Abstract

Today many painful procedures in goats are conducted, such as castration and dehorning. Although the Swedish law states that animals should not be subjected to unnecessary suffering, there are currently few analgesic drugs that are approved for goats. Previous studies have shown that the drug buprenorphine, for several reasons, is unsuitable for goats. The purpose of this study was to investigate whether the drug butorphanol may be an appropriate drug for goats by measuring different physiological parameters. The drug is currently approved for pain relief in horses, dogs and cats. In this thesis, the physiological changes that butorphanol may cause are investigated. In parallel with this, two other theses were written, one focused on the kinetics and the other was focusing on behavioral changes in the goats.

Eight goats, seven months old, not pregnant and not lactating were randomly assigned to one of two treatments in a so-called "cross-over design": saline or butorphanol. The experiment was repeated two weeks later where the goats were assigned the second treatment. The goats were acting as its' own positive control. At regular intervals, blood samples were taken, a total of 12 samples/ goat and test occasion. The blood samples were analysed for butorphanol and concentrations of cortisol, vasopressin, plasma proteins and hematocrit.

The results showed that the hematocrit and total plasma protein concentrations were significantly higher when the goats received butorphanol, but there were no differences in the concentrations of plasma cortisol and vasopressin between treatments. However, there were great individual differences.

In conclusion, the kinetics, physiology and behavior of the goats after butorphanol administration indicate that butorphanol may be an appropriate drug and analgesic for goats. However, more studies need to be performed.

## Sammanfattning

Idag genomförs många smärtsamma ingrepp på getter, så som kastrering och avhorning. Trots att det i svensk lagstiftning står att djur inte får utsättas för onödigt lidande finns det idag få smärtlindrande läkemedel som är godkända till get. Tidigare studier har visat att opioiden buprenorfin är olämpligt till getter. Syftet med den här studien var att genom att mäta olika fysiologiska parametrar undersöka om opioiden butorfanol kan vara eller inte vara ett lämpligt medel för getter. Läkemedlet är idag godkänt som smärtlindring till häst, hund och katt. I det här examensarbetet har de fysiologiska förändringarna som butorfanol kan ha gett upphov till undersökts. Parallellt med detta har ytterligare två examensarbeten skrivits, det ena med fokus på kinetiken och det andra med fokus på beteendeförändringar.

Åtta icke dräktiga, icke lakterande getter lottades slumpmässigt ut till en av två behandlingar i en så kallad "cross-over design" koksalt eller butorfanol. Försöket upprepades två veckor senare då getterna fick den andra behandlingen som de inte fick första gången. Getterna var därmed sin egen kontroll. Blodprover togs regelbundet, före och efter butorfanol-administreringen, respektive koksaltadministreringen och analyserades med avseende på butorfanolets kinetik samt hematokrit, plasmaprotein, kortisol och vasopressin. Vilken behandling djuren fick var under försöket okänt för de som utförde analyserna.

De fysiologiska resultaten visade att hematokriten och koncentrationen av totala plasmaproteiner var högre efter butorfanoladministreringen jämfört med när getterna fått koksalt. Det fanns inga skillnader mellan behandlingarna i koncentrationerna av kortisol och vasopressin. Resultaten var förvånande då opiaterna generellt brukar öka koncentrationen av kortisol i plasma. Getterna reagerade dock ytterst individuellt och vissa individer hade förhöjda nivåer av kortisol.

Sammanfattningsvis tyder resultaten från studierna i kinetik, fysiologi och beteende på att butorfanol under kortvarig smärta kan vara ett lämpligt läkemedel till getter. Dock måste fler studier göras på både friska getter och getter i smärttillstånd.



## Inledning

Avhorning och kastrering är vanliga praktiska ingrepp på djur inom lantbruket. I Sverige måste ingreppet ske under bedövning och utföras av en veterinär, undantag är kastrering av galkultingar under sju dagar (Jordbruksverket, 2011). Avhorning är ett stressfullt och smärtsamt ingrepp på killingar och det är därför viktigt att använda lugnande och smärtlindrande preparat vid avhorning (Alvarez och Gutiérrez, 2010). Dessvärre finns det få smärtlindrande preparat till mindre idisslare. De vanligaste lugnande och smärtlindrande preparat som används till getter är inte alltid godkända för djurslaget (Taylor, 1991). Detta innebär att de doser som ges till bland annat getter är godtyckliga och experimentella och de bieffekter som kan uppstå är inte dokumenterade (Taylor, 1991; Carroll *et al.*, 1998; Staffieri *et al.*, 2009). De beteendemässiga och fysiologiska studier som finns på idisslare är ofta inkonsekventa och tar sällan hänsyn till miljö, hantering eller smärta. Det är därför viktigt att studier på till exempel getter som inte upplever smärta också görs, för att eliminera felkällor i framtida studier (Carroll *et al.*, 1998).

Butorfanol är en syntetisk opioid som i strukturen liknar morfin och som används inom veterinärmedicin. Butorfanol är godkänt som smärtlindring till häst-, katt- och hunddjur och har en stark agonistisk verkan på  $\kappa$ -receptorn men även på  $\sigma$ -receptorn. Butorfanol har även en svag, antagonistisk verkan på  $\mu$ -receptorn och anses vara fem till sju gånger starkare än morfin (Schnellbacher, 2010).  $\kappa$ -,  $\mu$ - och  $\sigma$ -receptorerna tillhör gruppen opiat-receptorer och binder till peptiden dynorfin. Dynorfin är involverad i kroppens mekanismer för att minska smärta (Purves *et al.*, 2008). Opiater verkar genom att inhibera den nociceptiva stimulansen i ryggmärgens dorsala horn och hindrar supraspinala afferenta vägar. Därmed minskar frisättningen av neurotransmittorer till ryggmärgen (Schnellbacher, 2010).  $\kappa$ -receptorerna hämmar enzymet adenylatcyklas intracellulärt vilket leder till hyperpolarisering i cellmembranet, det vill säga ökar membranpotentialen. Denna hyperpolarisering leder till att nervimpulsen för överförande av uppåtgående smärtvägar hämmas (Molin, 2009).

Syftet med den här studien var att undersöka om opioiden butorfanol kan vara ett lämpligt preparat till getter (*Capra hircus*) genom att mäta olika fysiologiska parametrar. Det har tidigare visat sig att opioiden buprenorfin är ett olämpligt preparat till get på grund av kort halveringstid, hämmad idissling samt oroligt beteende (Bohman, 2008; Ingvast-Larsson *et al.*, 2007)

Parallellt med de fysiologiska analyserna gjordes kinetik- samt beteendestudier (se Gustavsson, 2012; Amnesten, 2012).

# Bakgrund

## *Smärta*

Smärta kan delas in i två huvudgrupper; nociceptiv smärta (vävnadsskadesmärta) och neurogen smärta (nervsmärta). Nociceptiv smärta stimuleras av nervceller med fria nervändslut med nociceptorer. Dessa receptorer kan stimuleras av yttre faktorer, så som mekanisk och/eller kemisk stimuli eller extrema temperaturer. Denna smärta är oftast akut och kan vara ett fysiologiskt svar på vävnadsskada. Nociceptiv smärta kan i sin tur delas upp i ytterligare två grupper; somatisk smärta samt visceral smärta. Nociceptiv smärta kan med fördel behandlas med primär analgetika så som opioider samt icke-steroida antiinflammatoriska och smärtstillande läkemedel (NSAID).

Neurogen smärta beror på skada på det centrala eller perifera nervsystemet. Det påverkade området blir oftast känsligare än övriga delar och kan även orsaka spontan smärta, till följd av spontan aktivitet i den skadade nerven (som hos människor kan upplevas som nociceptiv smärta, men som egentligen är neurogen). Fantomsmärta är ett resultat av neurogen smärta. Djur kan oftast inte förmedla om de upplever neurogen smärta och därför är det svårt att veta hur detta påverkar deras välmående. Neurogen smärta är även svårbehandlad (Hansson, 1997; Sjaastad *et al.*, 2007).

Förutom smärtreceptorer är även adrenerga receptorer (alfa ( $\alpha$ ) och beta ( $\beta$ )) aktiva vid en smärtsituation. Adrenalin och noradrenalin binder specifikt till dessa receptorer och agerar via intracellulära mekanismer (Lawrence, 2005).

I en studie gjord av Alvarez *et al.* (2009) visades det att lokalbedövning med lidocain inte hade någon smärtlindrande effekt på killingar vid avhorning. Killingarna i försöket visade beteendemässiga tecken på smärta och hade höga kortisolvärden. I ett annat försök utfört av Stilwell *et al.* (2009) använde man istället Xylazine som lugnande vid avhorning. Xylazine är ett vanligt använt läkemedel till mindre idisslare och fungerar som en agonist till  $\alpha_2$ -receptorn (Dzikiti *et al.*, 2009). Inte heller Stilwell *et al.* (2009) kunde påvisa en smärtlindrande effekt vid avhorning. Artikelförfattarna i både Alvarez och Stilwells studier menar att en kombination av lokalbedövning och lugnande medel kan ha en större smärtlindrande effekt, men att inga tillförlitliga sådana studier finns, då beteende och fysiologi inte har studerats samtidigt (Alvarez *et al.*, 2009; Stilwell *et al.*, 2009).

## ***Stress och fysiologiska parametrar som mätts i denna studie***

Då tidigare studier visat att opioider kan orsaka beteendemässiga förändringar såsom oro och stress (Bohman, 2008; Ingvast-Larsson *et al.*, 2007) valde vi att tillsammans med butorfanols kinetik och getternas beteende analysera förändringar i fyra fysiologiska variabler som skulle kunna förväntas förändras vid butorfanoladministreringen, nämligen plasmakoncentrationerna av kortisol, vasopressin, plasmaprotein samt hematokrit.

Psykisk påverkan och stress kan vara svårt att mäta. Oftast leder stress till en förändring i beteendet som inte stämmer överens med ett förväntat beteende i den miljö djuret befinner sig i, till exempel stereotypier

(McGlone, 1993; Jensen, 2006). Beroende på kön, art, ålder etc. kan individer reagera olika på samma stressfaktor (Jensen, 2006). Beteendemässiga förändringar och ökad aktivitet i det sympatiska nervsystemet är dock förväntade reaktioner när en individ försöker anpassa sig till en fysiologisk belastning (McGlone, 1993).

Det finns ingen gemensam definition av vad stress är (Moberg, 2000) utan begreppet stress används oftast för att förklara en individs fysiologiska och beteendemässiga svar på en hotfull eller obehaglig situation (Moberg, 2000; Gregory, 2004; Sjaastad *et al.*, 2007). Enligt Jensen (2006) uppstår stress när de normala reaktionsmönstren för att minska påfrestningen hos djuret inte räcker till.

Kroppen reagerar främst på två sätt vid psykisk påverkan och stress, vilka båda ofta följer varandra. Det första sättet, aktivering av "Hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA-axeln)" innebär att corticotropin releasing hormone (CRH) frisätts från hypotalamus och påverkar hypofysens framlob att frisätta adrenocorticotropic hormone (ACTH). CRH spelar även en stor roll när det gäller djurets beteendemässiga reaktion på stress (Aoyama *et al.*, 2008). ACTH stimulerar frisättningen av glukokortikoider från binjurebarken, t ex kortisol. Vid en psykisk eller fysisk belastning ökar ofta koncentrationen av kortisol i plasman. Kortisol har också viktiga metabola funktioner i kroppen. Det ökar bland annat nedbrytningen av protein och triglycerider i kroppen, ökar glukoskoncentrationen i blodplasman, genom att inhibera glukosanvändningen i vävnaden samt stimulera upptaget i hjärnan, och hämmar sekretionen av tillväxthormon. Vid högre koncentrationer verkar även kortisol antiinflammatoriskt.

Vasopressin bildas i hypotalamus men lagras och utsöndras från hypofysens baklob. Frisättning av vasopressin har också visat sig stimulera hypofysens framlob att frisätta ACTH. En ökad vasopressinkoncentration kan därför även öka kortisolhalten i blodplasma (Aoyama *et al.*, 2008).

Vasopressin eller antidiuretiskt hormon (ADH) som det också kallas, reglerar vätskebalansen i kroppen genom att öka återupptaget av vatten från njurarna. En ökad utsöndring av vasopressin kan stimuleras av att volymen av den extracellulära vätskan minskar, till exempel vid en kraftig minskning av blodvolym eller blodtryck. Vasopressin är också en potent blodtryckshöjare och frisätts bland annat vid kraftig blödning (Meyer *et al.*, 1989; Sjaastad *et al.*, 2007).

Det finns få studier på hur vasopressin påverkar det centrala nervsystemet hos idisslare (Aoyama *et al.*, 2008). I en studie där man undersökte hormonella förändringar hos idisslare under förlossning fann Hydbring *et al.* (1999) att koncentrationerna av vasopressin ökade markant hos getter under utdrivningsfasen av killingen, samt hos kvigor som hade svåra kalvningar. Detta indikerar att vasopressin kan ha ett samband med idisslares fysiska arbete kring förlossning eller smärtupplevelser.

Hypotalamus är även överordnat det autonoma nervsystemet. Vid påfrestande situationer stimuleras framförallt det sympatiska nervsystemet. Ett sympatikuspåslag ökar bland annat hjärtfrekvens och blodtryck och stimulerar frisättningen av adrenalin och noradrenalin från binjuremärgen samt frisätter lagrade erythrocyter (röda blodkroppar) från mjälten hos de djurslag som har en mjältreserv, t ex idisslare (Eriksson *et al.*, 1994). Ökad

erytrocytkoncentration i blodet innebär att hematokriten ökar (% röda blodkroppar i blodet) vilket kan användas som ett indirekt mått på att sympatiska nervsystemet är stimulerat. Hematokriten är även en indikator för plasmavolymförändringar. Normalvariationen i hematokrit för getter ligger mellan 24 – 38 % med ett medelvärde på 28 % (Sjaastad *et al.*, 2007).

Plasmaproteiner är proteiner som återfinns i blodplasman. De flesta plasmaproteiner produceras och frisätts från levern. Det vanligaste plasmaproteinet är albumin som håller kvar blodplasman i blodkärlen. Proteinormoner och antikroppar räknas också till plasmaproteiner men produceras inte i levern. Vissa plasmaproteiner fungerar som transportörer av fettlösliga hormoner, fettsyror eller järn, medan andra fungerar som koagulanter (Sjaastad *et al.*, 2007). Koncentrationen av plasmaproteiner kan liksom hematokriten användas som ett mått på plasmavolymförändringar. Genom att mäta både hematokrit och plasmaproteinkoncentration samtidigt kan man separera hematokritförändringar som beror på mjältstimulering (då endast hematokriten ökar) och de som beror på plasmavolymförändringar (både hematokrit och plasmaproteinkoncentration ökar parallellt). Exempelvis kan ett ökat blodtryck resultera i att vätska pressas ur kärlebädden och därmed resultera i både ökad hematokrit och plasmaproteinkoncentration (Eriksson *et al.*, 1994).

## Material och metoder

Både pilotförsöket samt huvudförsöket var godkänt av Uppsalas djurförsöksetiska nämnd.

### *Pilotförsök*

Ett pilotförsök genomfördes under våren 2011. Syftet var att se vilka beteendemässiga samt fysiologiska förändringar som kunde förväntas under huvudförsöket efter administration av butorfanol (Butador vet®, injektionsvätska innehållande butorfanol 10 mg/ml; Richter Pharma AG). Även dos och injektionsmetod bestämdes utifrån de kinetiska och fysiologiska resultaten från pilotprojektet. I pilotstudien användes två getter, ca 1 år gamla, icke dräktiga och icke lakterande. Dosen bestämdes till 0.1 ml/kg enligt tidigare studier (Caroll *et al.*, 1998). Genom lottning bestämdes vilken get som skulle få butorfanol administrerat subkutant och vilken get som skulle få butorfanol intravenöst. Syftet med intravenös administration var att få fram en säker studie av kinetiken då intravenös administrering snabbare går ut i blodet. Dock är en intravenös metod ofta mer besvärlig att använda kliniskt. Blodprov togs med jämna intervall för att kunna mäta hematokrit samt analysera skillnader i halveringstid för butorfanol mellan de olika administreringsmetoderna. Hematokriten hos båda getterna ökade märkbart efter det att getterna fått butorfanol. Däremot sjönk hematokriten snabbare hos geten som fått butorfanol subkutant. Även beteendet hos de båda getterna förändrades. Geten som fått intravenöst rullade mer med huvudet och var orolig medan geten som fått subkutant var lugnare.

Koncentrationen butorfanol i blodet var mindre hos geten som fått butorfanol administrerat subkutant än hos geten som fått butorfanol intravenöst där butorfanolkoncentrationen minskade drastiskt efter bara tio minuter (från 36,5 ng/ml till 16,6 ng/ml). Effekten höll dessutom i sig längre hos geten som fått butorfanol subkutant. Efter pilotförsöket beslutades att dosen skulle dubbleras till 0.2 ml/kg under huvudförsöket då butorfanolkoncentrationen i plasma var låg och getterna inte verkade speciellt påverkade beteendemässigt. Denna nya butorfanoldos stämde väl överens med de rekommendationer som Taylor (1991) angivit och som även användes i studien gjord av Dzikiti *et al.* (2009).

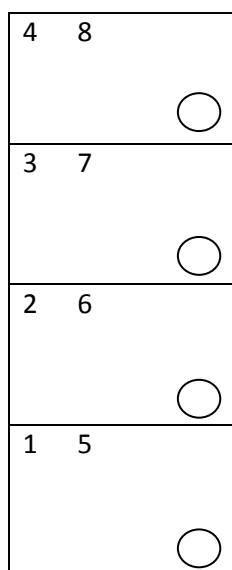
### *Huvudförsök*

Vid huvudförsöket lottades åtta jämgamla hongetter, av rasen Svensk Lantras, ut slumpmässigt till två grupper med fyra getter i vardera grupp (i fortsättningen refererade som "grupp 1" och "grupp 2"). Getterna tillhör och huseras på institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi på Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) i Uppsala. Huvudförsöket utfördes under oktober månad 2011 under fyra heldagar. De två grupperna deltog vid två försökstillfällen vardera med två veckors mellanrum i en så kallad cross-over-design.

I varje grupp slumpades två getter till butorfanolbehandling och två getter till behandlingen med koksaltlösning, vilket kan ses i tabell 2 och 3. Varje get var sin egen kontroll och det var vid försökstillfället okänt för personerna som utförde beteendestudien, samt de fysiologiska analyserna vilken get som fått koksalt eller butorfanol.

## ***Djuren***

Hongetterna var vid försökets utförande sju månader gamla, icke dräktiga eller lakterande och vägde mellan 23 – 34 kg. Getterna var vana vid människor och hade tränats på att stå i ensambox, att ha bandage runt halsen samt att bli fasthållna för att efterlikna försöksdagarna så mycket som möjligt. Under försökstillfället stod getterna i ensamboxar (1,2 m x 1,5 m) som angränsade till varandra. De kunde se och höra andra getter samt nosa på sina närmsta grannar genom boxgallret. Boxarna var försedda med halm och fri tillgång till vatten. Hö gavs vid tre tillfällen; morgon (ca kl 07), middag (ca kl 12) samt kväll (ca kl 15) Getterna stod i samma ordning vid de båda försökstillfällena (se figur 1). När getterna inte gick i försök var de tillsammans i en gruppbox (6,6 m x 12 m) som är ströad och miljöberikad. Getterna hade där fri tillgång till vatten och utfodrades morgon och kväll.



*Figur 1.* Schematisk bild över boxdesignen för försökstillfället. Heldragen linje representerar galler, cirkel representerar vattenhink och siffran representerar djuren (se tabell 2) i den ordning de stått vid båda sina försökstillfällena.

## ***Försöksupplägg***

Getterna rakades och fick lokalbedövning med hjälp av EMLA (Ointment lidocaine 25 mg/g, prilocaine 25 mg/g, AstraZeneca, Södertälje, Sweden) som fick verka minst en timme innan en permanentkateter sattes i höger- eller vänster jugularven. Varje get fick 0.2 ml/kg butorfanol (Butador vet®, injektionsvätska innehållande butorfanol 10 mg /ml; Richter Pharma AG) eller motsvarande mängd koksalt (Natriumklorid 9 mg/ml, Fresenius Kabi, Uppsala, Sverige) administrerat subkutant. Efter två veckor upprepades försöken och de getter som fått butorfanol fick istället koksaltlösning och vice versa. Genom att använda en cross-over-design fungerade getterna som sin egen kontroll. Tolv blodprov per get togs under försöksutförandet, schema kan ses i tabell 1.

*Tabell 1.* Tidpunkt (min) för blodprovstagning innan och efter administration av koksalt eller butorfanol. Första blodprovet togs ca kl 09.30 på försöksdagen. Administration av koksalt/butorfanol skedde ca kl 10.00 på försöksdagen. Sista blodprovet togs mellan kl 08.00 – 09.00 dagen därpå

Provnummer	Tidpunkt (minuter)
1	- 30
2	- 10
3	5
4	15
5	30
6	60
7	120
8	240
9	360
10	480
11	660
12	1260

Vid varje blodprov togs åtta ml blod som fördelades i två stycken fyra ml EDTA-rör. Till det ena EDTA-röret hade 200 µl Trasylol (Aprotinin 10.000 KIE, Bayer Health Care AG Leverkusen, Tyskland), tillsatts. Dessa rör användes sedan för analys av kortisol och vasopressin då Trasylol hjälper till att bevara hormonerna stabila i frysen. Ur de andra EDTA-rören som inte hade Trasylol tillsatt analyserades hematokrit och plasmaprotein samt butorfanol (Gustavsson, 2012).

*Tabell 2.* Visar vilken individ i grupp 1 som fick vilken behandling beroende på försökstillfälle (markerat med ett X). Siffran efter djuret, inom parentes, är den ordning i vilken de stått i boxarna (Figur 1)

Djur	Försökstillfälle	Butorfanol	Koksalt
Kivi (1)	1	X	
Guava (2)	1		X
Druva (3)	1	X	
Persika (4)	1		X
Kivi (1)	3		X
Guava (2)	3	X	
Druva (3)	3		X
Persika (4)	3	X	

Tabell 3. Visar vilken behandling individen i grupp 2 fick beroende på försökstillfälle (markerat med ett X). Siffran efter djuret, inom parantes, är den ordning i vilken de stått i boxarna (Figur 1)

Djur	Försökstillfälle	Butorfanol	Koksalt
Sharon (5)	2		X
Passion (6)	2	X	
Mango (7)	2	X	
Plommon (8)	2		X
Sharon (5)	4	X	
Passion (6)	4		X
Mango (7)	4		X
Plommon (8)	4	X	

### *Analysmetoder*

För direktanalys av hematokrit, fylldes blod upp i två stycken microrör/kapillär rör och centrifugerades i fem minuter i en hematokritcentrifug (LIC, Lars Ljungberg, S- 171 83 Solna/Sweden). Rören avlästes för hand med hjälp av en hematokrit-avläsare (AIC 1498).

EDTA-rören centrifugerades sedan i 4 °C, 1500 x g, i tjugo minuter i en Hettichcentrifug (Universal 30 RF). Plasman pipetterades sedan upp i ellemanrör. Totala plasmaproteinkoncentrationen analyserades med hjälp av en refraktometer (LEICA, TS-meter, Goldberg, Leica Inc. Opical Products Division, Buffalo, NY, USA). Blodplasman frystes, först i -20°C under minst ett dygn och flyttades sedan till -70°C.

Kortisol analyserades med hjälp av Cortisol ELISA (Ref:RE52061, IBL Gesellschaft für immunchemie und immunbiologie MBH, Flughafenstrasse 52a, D.22335 Hamburg, Germany). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) är en analysmetod för att mäta koncentrationen av ett okänt antigen, i det här fallet plasmakortisol. Metoden bygger på principen att en okänd koncentration av ett antigen läggs i brunnar tillsammans med en känd koncentration antikroppar. I brunnarna finns en antikropp som specifikt binder till aktuellt antigen, därefter sköljs brunnarna så att överflödigt antigen som inte bundit till antikroppen försvinner och den kända antikroppen tillsätts. Den kända antikroppen har ett enzym kopplat till sig och binder enbart till den primära antikroppen i brunnen. Det är enzymet som sedan ger brunnarna färg och som analyseras i fotometern. Tidigare användes ofta RIA (radio-immuno-assay) för analys av hormoner, men på grund av radioaktiviteten har ELISA börjat användas allt oftare.

Kortisol analyserades enligt bifogad manual med avvikelserna att två extra lägre punkter i standardkurvan infördes, 13,8 nmol/l samt 27,6 nmol/l. Sammanlagt användes fyra Microtiter-plattor (12\*8), täckta med anti-kortisol antikropp (kanin, polyklonal). 20 µl standard, kontroll och prov tillsattes till varje brunn. För varje behandling analyserades prov 1 – 8 (se tabell 1) för varje get. Varje prov lades i två brunnar på microtiter-plattan. Ett medelvärde av dubbletterna för varje prov och get användes för statistisk analys.

Brunnarna mättes med en fotometer vid 450 nm (Referensvåglängd: 600 – 650 nm) inom tio minuter. Koncentrationen beräknades sedan logaritmiskt i



ett multicalcprogram. Minsta detekterbara värde var 7,23 nmol/l. Inter assay var % CV < 10 % = 24,76 – 1799 nmol/l. Recovery var 135 %.

Vasopressin analyserades med hjälp av EIA (Enzyme Immuno Assay), Enzo, Enabling Discovery in Life Science (ca.no.ADI-900-017). Analysen gjordes enligt medföljande instruktioner med tillägg av en extra lägre punkt i standardkurvan; 1,9 pmol/l. Proverna var spädda två gånger. Precis som vid kortisolanalysen användes prov 1 – 8 för varje get och behandling. Varje prov lades som dubletter i microtiter-plattorna och medelvärdet mellan dubletterna användes till statistisk analys. Minsta detekterbara värde var 0,42 pmol/l. Inter assay var % CV < 10 % = 1,30-154,3 pmol/l. Recovery var 96,9 %.

Hormonanalyserna utfördes av BMA Gunilla Drugge på institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi.

### ***Statistik***

Resultaten från de olika mätningarna sammanställdes till ett dokument som sedan analyserades.

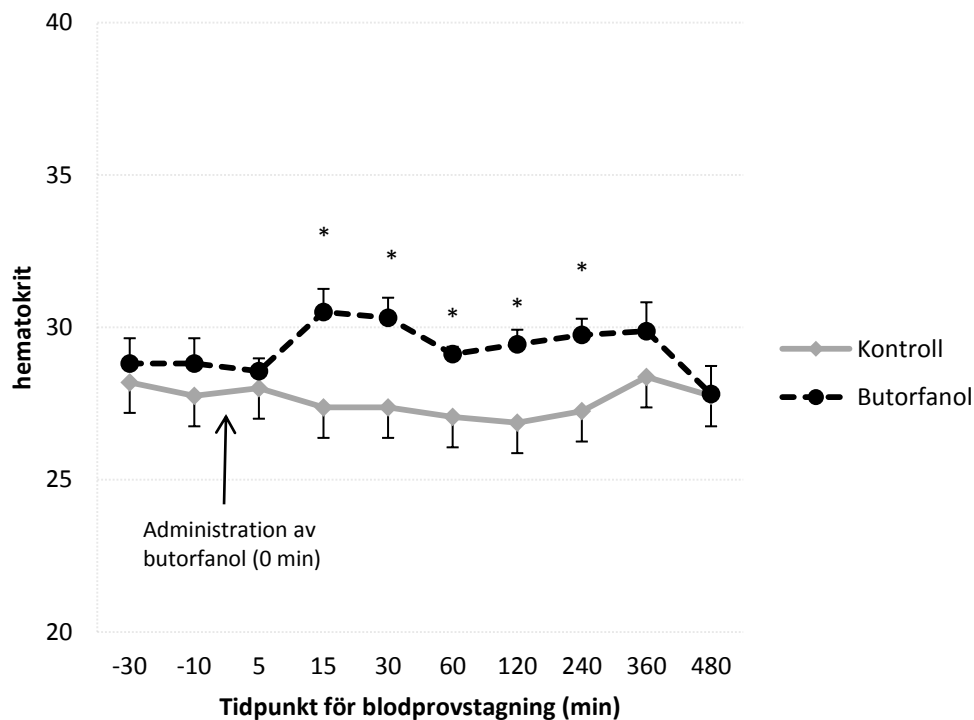
All data analyserades med SAS Software (SAS 2008. Statistical Analysis Systems. 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA.) Resultaten presenterades som medelvärden för varje prov  $\pm$  standardfel. Vidare beräkningar för att få fram signifikanta skillnader inom och mellan behandling gjordes med hjälp av ANOVA (Mixed procedure). Blodprov 2 valdes ut som kontroll och alla jämförelser inom behandling gjordes mot detta prov. Den statistiska modellen som användes inkluderade den fixa effekten av prov och den slumpmässiga effekten av djur. Signifikansnivån sattes till  $p \leq 0,05$ .

## Resultat

Medelvärden och standardfel för hematokrit, plasmaprotein, kortisol samt vasopressin för de två behandlingarna kan ses i figur 2 – 5 nedan. Diagram för varje parameter och individ kan ses i bilaga 1 – 4.

### Hematokrit

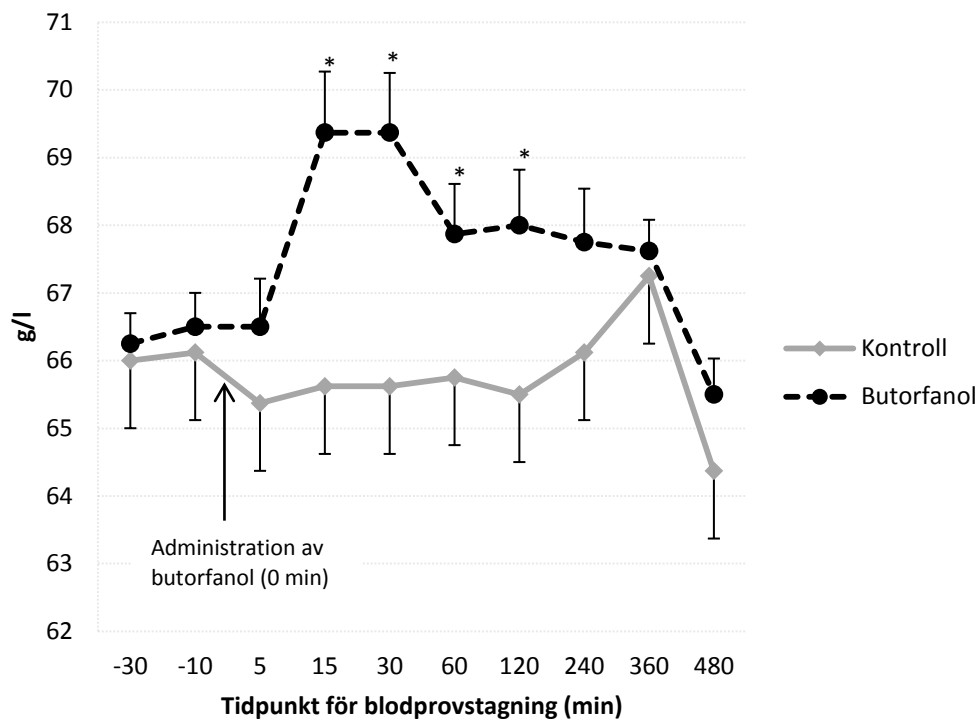
När getterna fick butorfanol tenderade hematokriten stiga efter 15 minuter men ökningen var inte signifikant ( $P=0.06$ ). Hematokriten var dock signifikant högre när getterna fick butorfanol jämfört med koksalt 15-240 minuter efter administreringen (Figur 2).



*Figur 2.* Förändringar i hematokrit före och efter administrering av butorfanol eller koksalt hos åtta getter. Det var inga signifikanta skillnader inom behandling mot prov 2 efter administrering av koksalt eller butorfanol. När getterna fick butorfanol var hematokriten signifikant högre än jämfört med när de fick koksalt mellan tiderna 15, 30, 60, 120 samt 240 minuter efter administrering. Signifikans mellan behandlingarna utmärks med \*. Medelvärde  $\pm$  SE.  $P \leq 0.05$ .

## Plasmaprotein

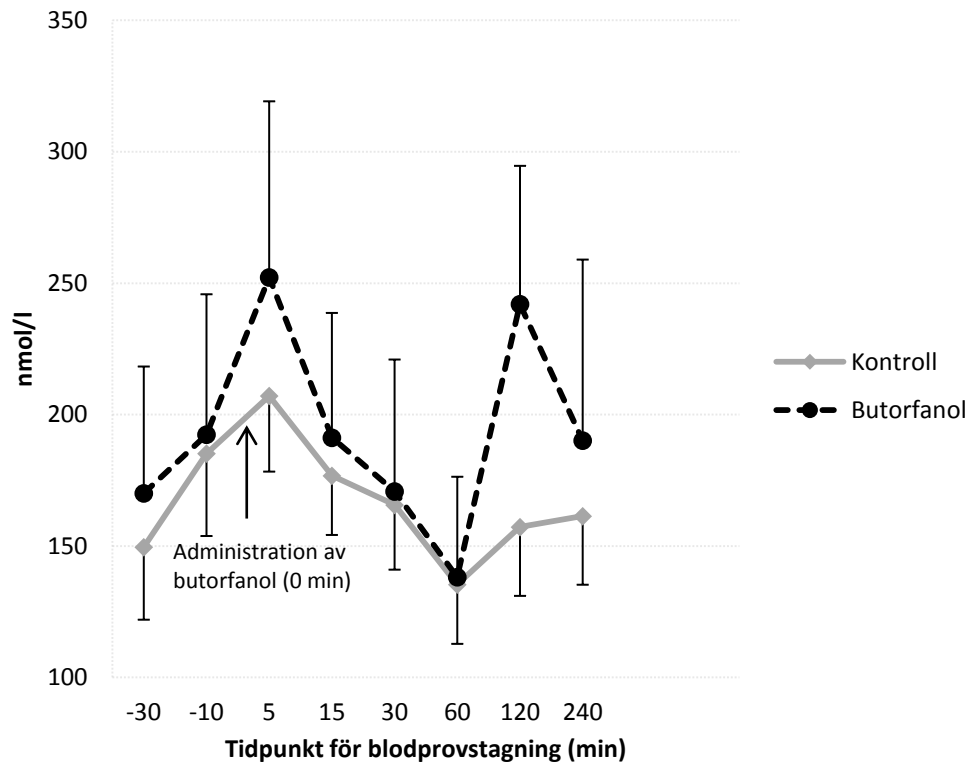
Koncentrationen av totala plasmaproteiner ökade signifikant 15-30 min efter butorfanoladministrering men inte när getterna fick koksalt. När getterna fick butorfanol var koncentrationen av plasmaproteiner signifikant högre 15-120 minuter efter administrering jämfört med när de fick koksalt (Figur 3).



Figur 3. Förändringar i plasmaprotein före och efter administrering av butorfanol eller koksalt hos åtta getter. Det var signifikanta skillnader inom behandling mot prov 2 efter butorfanoladministrering i proverna 4 och 5. Det fanns ingen signifikans mot prov 2 efter administrering av koksalt. När getterna fick butorfanol var plasmaproteinkoncentrationen signifikant högre än jämfört med när de fick koksalt mellan tiderna 15, 30, 60 samt 120 minuter efter administrering. Signifikans mellan behandlingarna utmärks med \*. Medelvärde  $\pm$  SE.  $P \leq 0.05$ .

## Kortisol

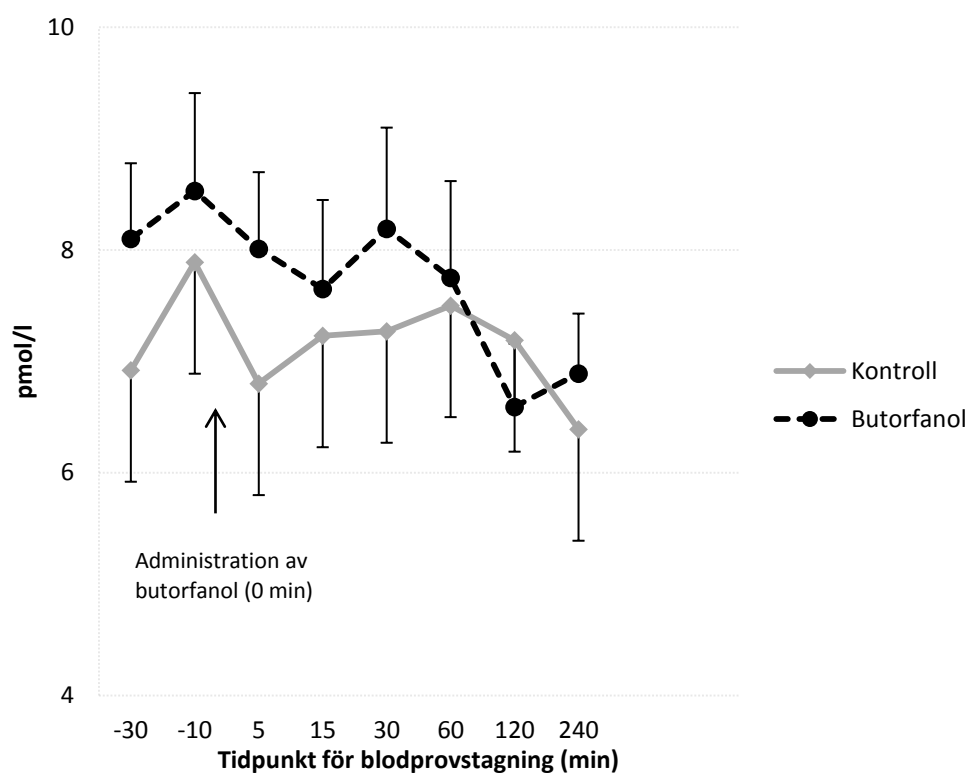
Det fanns inga skillnader i kortisolkoncentration inom eller mellan behandlingar men det förelåg stora individuella skillnader (Figur 4).



Figur 4. Förändringar i kortisolnivå före och efter administrering av butorfanol eller koksalt hos åtta getter. Ingen signifikans mot prov 2 inom respektive behandling kunde hittas. Inte heller signifikans mellan de två behandlingarna kunde hittas. Medelvärde  $\pm$  SE.  $P \leq 0.05$ .

## Vasopressin

Det förelåg inga skillnader inom eller mellan behandlingar i vasopressinkoncentrationer under försöket (Figur 5).



Figur 5. Förändringar i vasopressin före och efter administrering av butorfanol eller koksalt hos åtta getter. Ingen signifikans mellan prov 2 och övriga prov inom respektive behandling kunde hittas. Inte heller signifikans mellan behandlingarna hittades. Medelvärde  $\pm$  SE.  $P \leq 0.05$ .

## Diskussion

I denna studie orsakade butorfanoladministrering högre hematokrit och plasmaproteinkoncentration men inte högre kortisol- eller vasopressinkoncentrationer jämfört med koksaltbehandlingen. Att ingen signifikans kunde påvisas gällande kortisol eller vasopressin var förvånande med tanke på att getterna reagerade beteendemässigt (Amnsten, 2012), men Carroll *et al.* (1998) kunde inte heller finna signifikanta skillnader i plasmakortisolvärden mellan koksalt- och butorfanolbehandling. En trolig orsak skulle kunna vara att de starka individuella variationerna i koncentrationen av kortisol och vasopressin tog bort statistisk signifikans och att det därför skulle behövas ett större antal djur för att detektera signifikanta skillnader. Carroll *et al.* (1998) kunde dock konstatera signifikans i hjärtfrekvens vilket överensstämmer med signifikanserna i de mer sympatikusreglerade variablerna hematokrit och plasmaprotein (Eriksson *et al.*, 1994). Fox *et al.* (1998) fann att administration av butorfanol innan livmodersoperation hos tikar ökade koncentrationen av kortisol. Däremot var nivåerna av kortisol signifikant lägre när butorfanol administrerades efter operationen. Skillnaden mellan arter tycks vara av stor betydelse när det gäller butorfanol. En annan möjlig förklaring till varför butorfanol inte påverkade kortisol- eller vasopressinkoncentrationerna kan bero på butorfanolets inverkan på  $\kappa$ -receptorerna vilket skiljer sig från t ex buprenorfin. Då det finns få studier gjorda på receptorernas påverkan behöver detta dock studeras närmare. Då det finns olika typer  $\kappa$ -receptorer är det möjligt att getter reagerar annorlunda på butorfanol än andra djurslag. Det finns även lite data om hur butorfanol påverkar kortisolkoncentrationen hos friska djur, vilket har gjort att tidigare studier inte kunnat dra tydliga slutsatser om butorfanols inverkan.

En intressant observation är att alla åtta getter fick en tydlig ”topp” i sin kortisolkurva 120 min efter administrering av butorfanol, oavsett vilken av de fyra försöksdagarna geten fick butorfanol respektive koksalt. Även vasopressin hade en liknande ökning hos vissa getter vid samma tidpunkt. Toppen kan bero på att getterna utfodrades vid detta tillfälle. Några av getterna fick även en ökning i hematokrit och, plasmaprotein men då vid 360 minuter efter att de fått butorfanol. Förändringarna kunde till viss del korreleras till beteendeförändringar vid samma tidpunkter, då man kan utläsa att getterna var betydligt mer aktiva genom att stå/gå eller äta/plocka med foder. Tittar man på individkurvorna från beteendestudien kan man även se att några getter fortfarande verkade vara påverkade av butorfanolet genom att de var väldigt oroliga och aktiva (Amnsten, 2012). Bland individkurvorna kan man även se att de individer som reagerat starkt på butorfanol även tycks ha påverkat sina grannar. Tittar man till exempel på Druva och Persika (som stod bredvid varandra) kan man se att hematokriten på Druva, då hon fått koksalt, toppar samtidigt som Persikas hematokrit, då Persika fått butorfanol. Man kan även göra liknande jämförelser i vasopressin mellan Guava och Kiwi samt Guava och Druva, där Guavas vasopressinkoncentrationer ligger väldigt högt. Även om det inte finns belägg för att olika parametrar ska följa varandra kan man se vissa tendenser hos olika individer. Jämför man varje individs reaktion mellan de olika parametrarna kan man se att generellt följer hematokrit och plasmaprotein varandra. Bland vissa individer kunde man se ett liknande samband för kortisol och vasopressin, eller mellan alla fyra parametrar, medan andra

individer inte tycks ha något samband mellan parametrarna över huvud taget (se bilagan).

Det tycks finnas ett samband mellan getternas beteende och förändringar i hematokrit och plasmaproteinkoncentration. Nivåerna var som högst då det var som stökigast i stallet, vilket det oftast var precis när getterna fått butorfanol. Några getter reagerade beteendemässigt väldigt starkt, men trots detta är deras nivåer av kortisol och/eller vasopressin inte så höga (för beteende se Amnesten, 2012). Druva, Mango och Kiwi hade i början väldigt höga värden av butorfanol i blodet. Ungefär samtidigt var även deras hematokrit, plasmaprotein- och vasopressinkoncentration hög, däremot var kortisolnivåerna låga. Passion hade relativt låg koncentration av butorfanol i blodet, hon hade dock höga nivåer av hematokrit, plasmaprotein-, kortisol- samt vasopressinkoncentration. Även Sharon hade låg koncentration av butorfanol men hematokriten och plasmaproteinkoncentrationen var dock relativt höga men även ganska stabila, däremot hade hon låga nivåer av både kortisol och vasopressin. Risken för stora felkällor gällande analyserna bedömer jag som liten. Tveksamma resultat vid avläsningen av hematokrit och plasmaproteinkoncentration har avlästs av två personer. Vid hematokritanalysen användes ett medelvärde mellan två rör från samma blodprov. Om det fanns en skillnad på mer än 2% mellan de två rören ströks det minst troliga röret, alternativt gjordes analysen av blodprovet om. Detta hände dock endast en gång. Även hormonanalyserna var tillförlitliga och utförda av en erfaren biomedicinsk analytiker. Den stora individuella variationen gör att det är svårt att veta hur butorfanol påverkar fysiologin. Enligt ett försök gjort av Aoyama *et al.* (2008) fanns det ett samband mellan beteende och kortisolnivåer, en hög koncentration av kortisol gav en stark beteendeförändring. Trots detta finns det inget stöd i denna studie att så är fallet. Det skulle dock behövas fler butorfanolstudier, dels på friska getter för att se hur substansen påverkar  $\kappa$ -receptorerna, men även på getter i smärttillstånd för att undersöka vilken smärtlindrande effekt det har då det visat sig att getter reagerar annorlunda än de djurslag till vilka butorfanol är godkänt. Även studier på tolerans skulle kunna vara aktuellt.

Det är väldigt intressant att en så homogen grupp med getter kan uppvisa så stora individuella skillnader i hormonkoncentrationer, både basalt och vid administrering av butorfanol men vad detta kan bero på får vidare studier utvisa.

## **Slutsats**

Av de resultat som framkommit i kinetik, beteende och fysiologi tycks butorfanol ha liten negativ inverkan på friska getter, vilket skulle kunna göra det lämpligt som läkemedel för smärtlindring till getter under en kort period. Ytterligare studier krävs dock för att studera läkemedlets smärtlindrande effekter hos getter som har ont.

## Referenser

- Alvarez L, Gutiérrez J. (2010) A first description of the physiological and behavioral responses to disbudding in goat kids. *Animal Welfare* 19, 55-59
- Alvarez L, Nava R.A, Ramírez A, Ramírez, E, Gutiérrez J. (2009) Physiological and behavioural alterations in disbudded goat kids with and without local anaesthesia. *Applied Animal Behaviour Science* 117, 190–196
- Amnsten J. (2012) Beteendeförändringar vid användning av opioiden butorfanol till friska getter. Examensarbete Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet [opublicerat]
- Aoyama M, Negishi A, Abe A, Yokoyama R, Ichimaru T, Sugita S. (2008) Physiological and behavioural effects of an intracerebroventricular injection of corticotropin releasing hormone in goats. *The Veterinary Journal* 177, 116–123
- Bohman M. (2008) Buprenofin till get. Examensarbete 2008:55. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet (ISSN 1652-8697)
- Caroll G.L, Hartsfield S.M, Champney T.H, Slater M.R, Newman J.A. (1998) Stress-related hormonal and metabolic responses to restraint, with and without butorphanol administration in pre-conditioned goats. *Laboratory Animal Science*. 48:4, 387 – 390
- Dzikiti T.B, Stegmann G.F, Hellebrekers L.J, Auer RE, Dzikiti L.N. (2009) Sedative and cardiopulmonary effects of acepromazine, midazolam, butorphanol, acepromazine-butorphanol and midazolam-butorphanol on propofol anaesthesia in goats. *Journal of the South African Veterinarian Association*. 80:1, 10-6.
- Eriksson L, Hydbring E, Tuomisto L , MacDonald E, Kokkonen U-M, Olsson K. (1994) Intraruminal fluid administration to goats: Effects of handling and fluid temperature. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 35, 289-298
- Fox S.M, Mellor D.J, Lawoko C.R.O, Hodge H, Firth E.C. (1998) Changes in plasma cortisol concentrations in bitches in response to different combinations of halothane and butorphanol, with or without ovariohysterectomy. *Research in Veterinary Science* 65, 123-133
- Gregory N.G. (2004) Physiology and behaviour of animal suffering. Oxford: Blackwell science
- Gustavsson H. (2012) Butorfanol till get: Farmakokinetik efter subkutan injektion. Examensarbete 2012:29. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet (ISSN 1652-8697)
- Hansson P. (1997) Nociceptiv och neurogen smärta 2:a upplagan. Stockholm.
- Hydbring, E., A. Madej, E. MacDonald, G. Drugge-Boholm, B. Berglund and K. Olsson. (1999) Hormonal changes during parturition in heifers and goats are related to the phases and severity of labour. *Journal of Endocrinology*. 159, 75-85
- Ingvast-Larsson, C, Svartberg K., Hydbring-Sandberg E, Bondesson U, Olsson K.. (2007) Clinical pharmacology of buprenorphine in healthy, lactating goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 30, 249–256
- Jensen, P. (2006) Stress, beteendestörningar och välfärd. I: Djurens beteende och orsakerna till det. Stockholm: Natur och Kultur



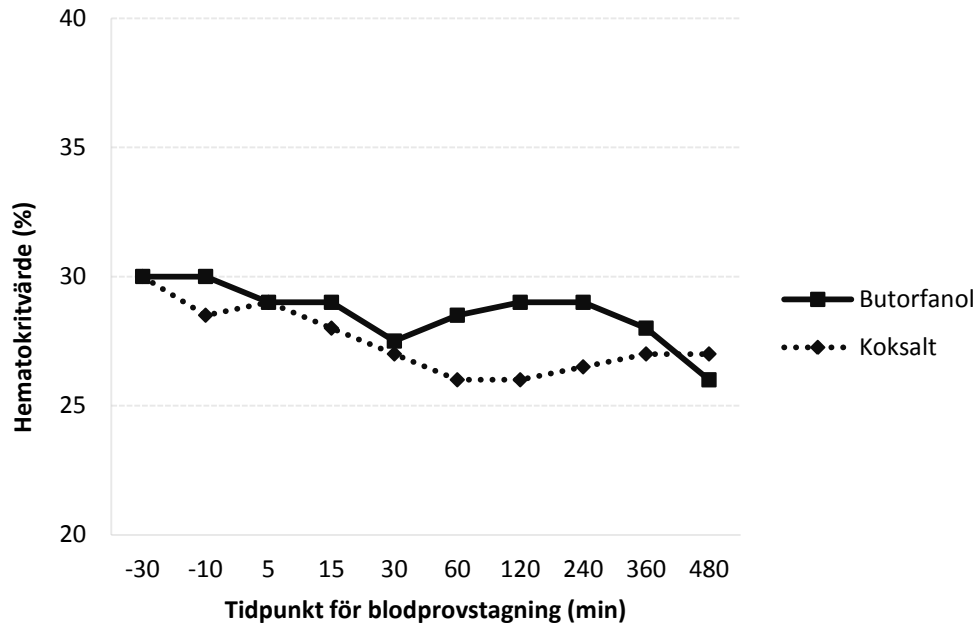
- Jordbruksverket. (2011) Hemsida. Djur; Får och Getter: Operativa ingrepp och hormoner. [Online] Tillgänglig:  
<http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/djur/farochgetter/operativaingreppochhormoner.4.4b00b7db11efe58e66b8000554.html>
- Lawrance, E. (Red) (2005) Henderson's dictionary of biology, 13:e upplagan. Harlow, England. Pearson Education Limited
- McGlone J.J. (1993) What is animal welfare? *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 26-36
- Meyer A.H, Kanghans W, Scharrer E. (1989) Vasopressin reduces food intake in goats. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 74, 465-473
- Moberg G.P. (2000) Biological Responses to stress: Implications for Animal Welfare. I: Moberg G.P (Ed), Mench J.A (Ed) *The Biology of Animal stress*. 1 – 21. Wallingford: CABI Publishing
- Molin E. (2009) Effekt av premedicinering med detomidine i kombination med butorfanol på hudreaktivitet vid intradermaltest på friska hästar. Examensarbete 2009:44. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet (ISSN 1652-8697)
- Purves D, Augustine G.J, Fitzpatrick D, Hall W.C, LaMantia A-S, McNamara J.O, White L.E (eds) (2008) Neurotransmitters and their receptors samt Pain i: *Neuroscience* 4:e upplagan. 145 – 146 samt 250. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Schnellbacher R. (2010) Butorphanol. *Journal of Exotic Pet Medicine* 19:2, 192–195
- Sjaastad Ø.V, Hove K, Sand O. (2007) *Physiology of domestic animals*, 209 – 210, 224, 227, 158 samt 282 . Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Staffieri F, Driessen B, Lacitihnola L, Crovace A. (2009) A comparison of subarachnoid buprenorphine or xylazine as an adjunct to lidocaine for analgesia in goats. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 36, 502-511
- Stilwell G, Carvalho R.C, Carolino N,nLima M.S, Broom D.M. (2009) Effect of hot-iron disbudding on behaviour and plasma cortisol of calves sedated with xylazine. *Research in Veterinary Science* 88, 188–193
- Taylor P.M. (1991) Anaesthesia in sheep and goats. *In Practice* 13, 31-26

# Bilagor

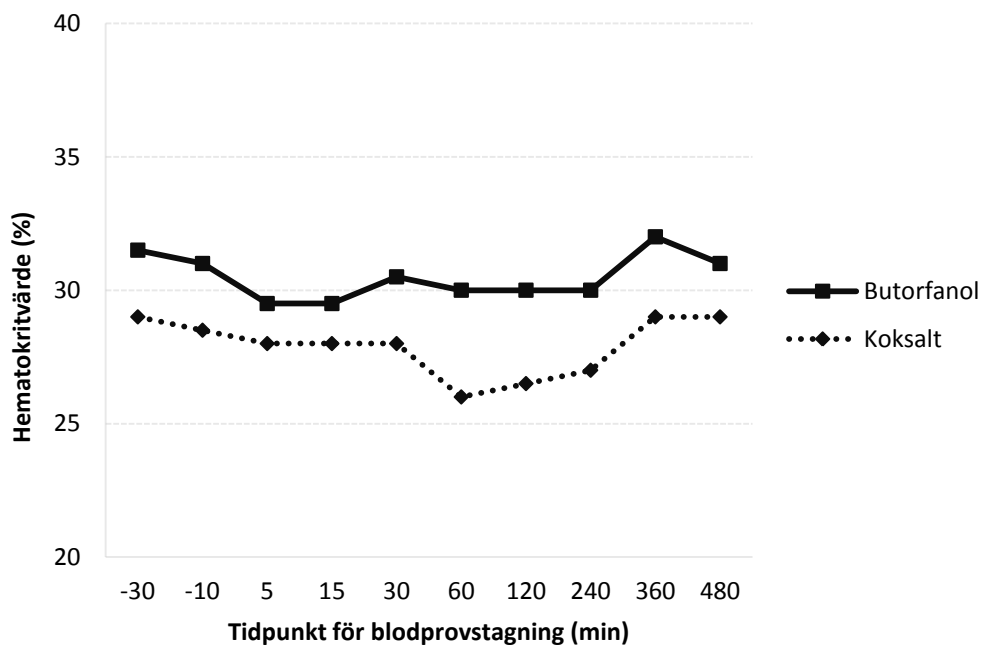
## Bilaga 1

Individkurvor för hematokrit.

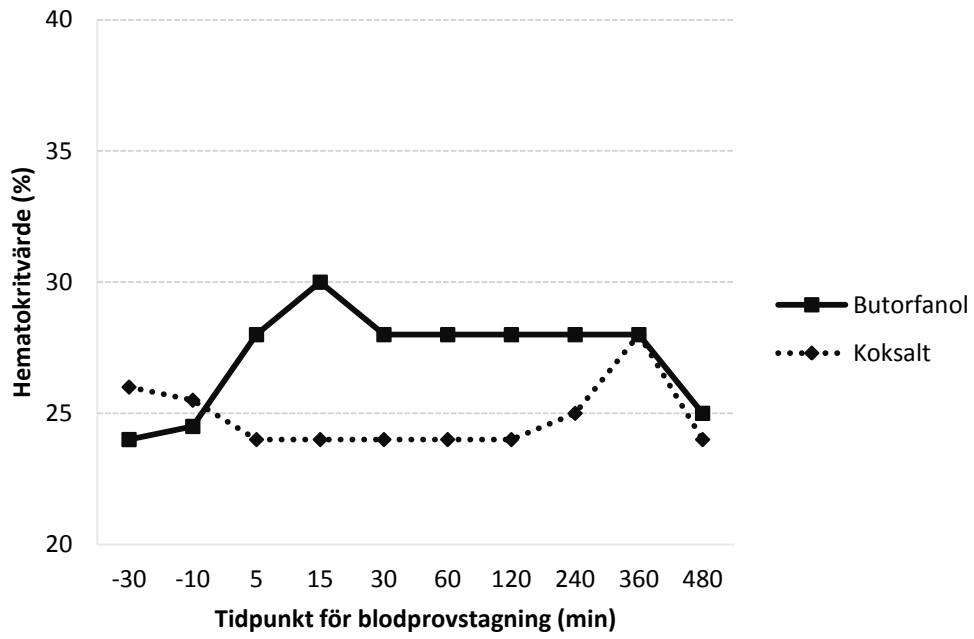
### Kiwi



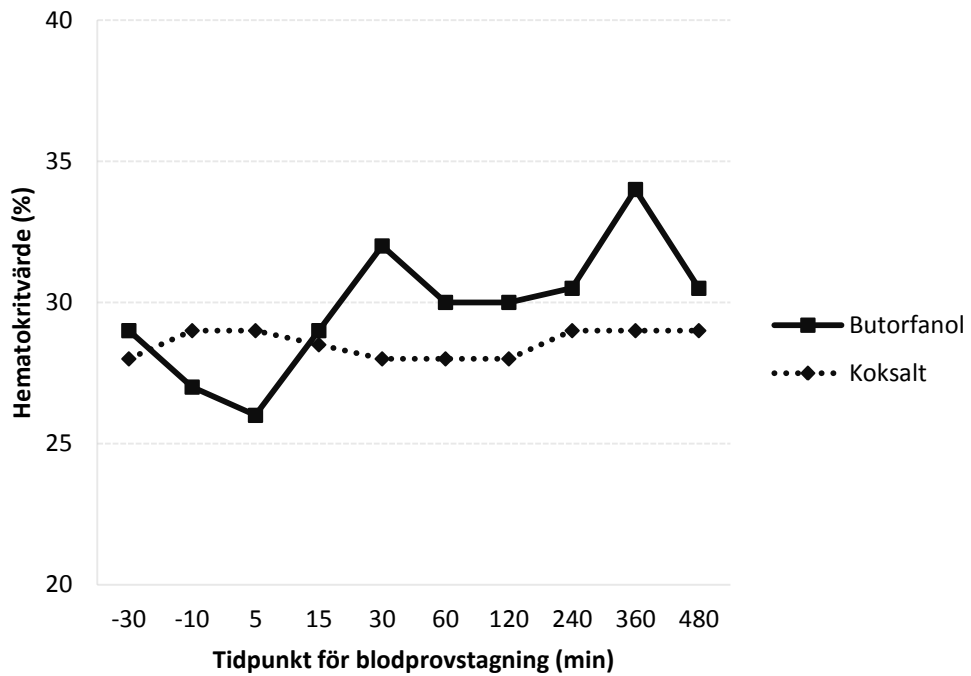
### Guava



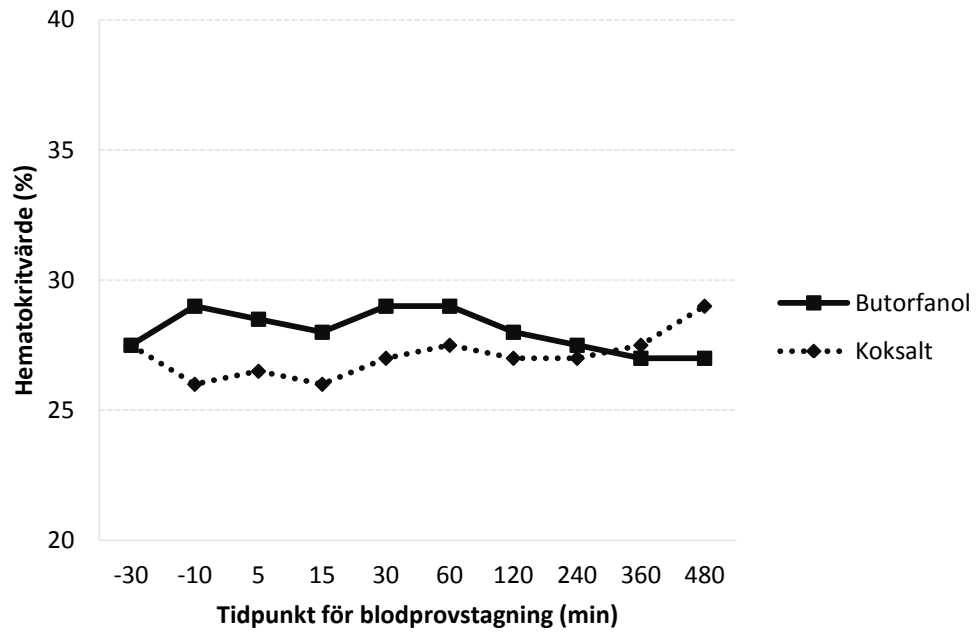
## Druva



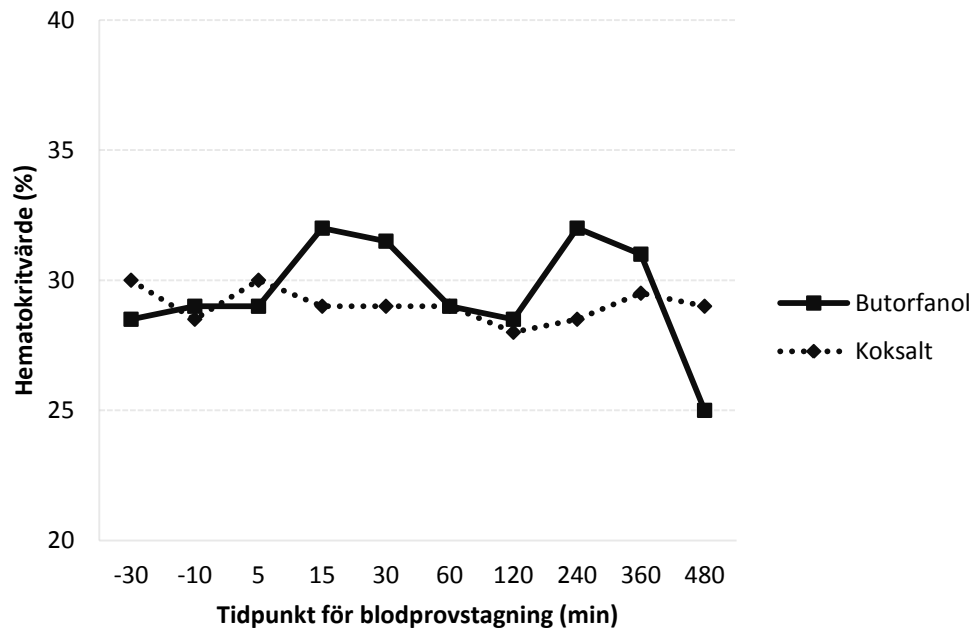
## Persika



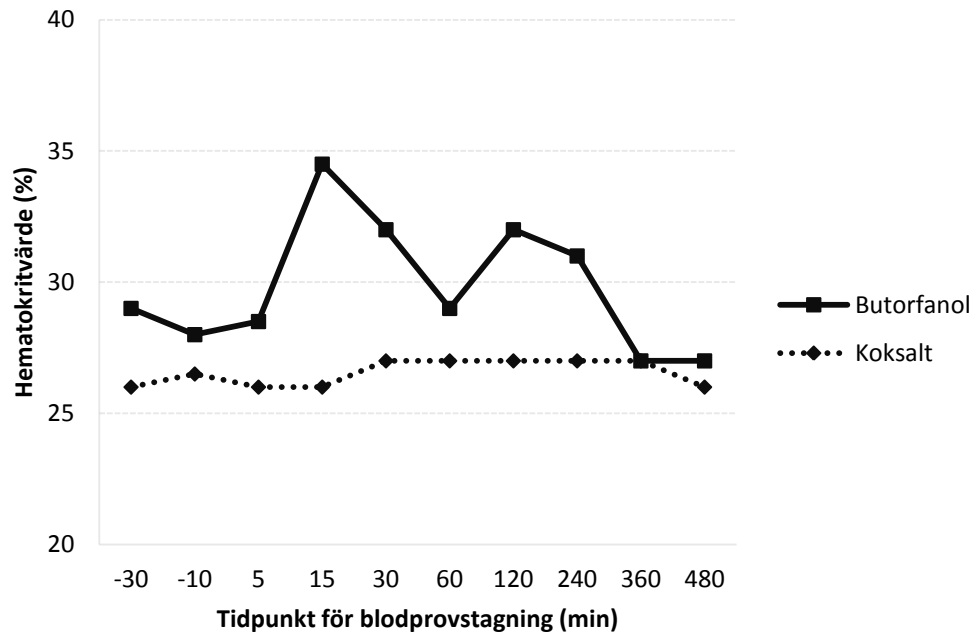
## Sharon



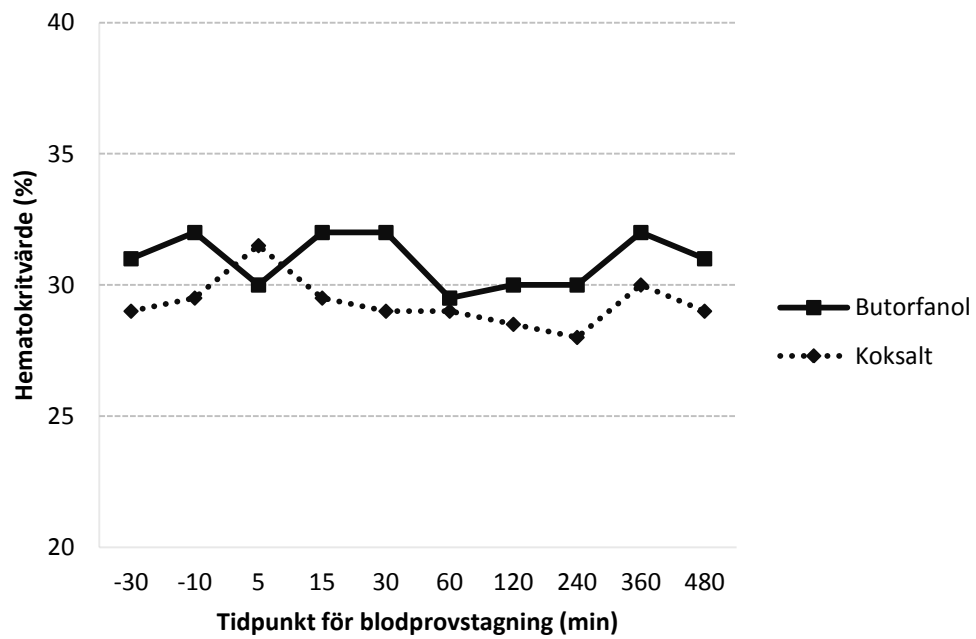
## Passion



## Mango



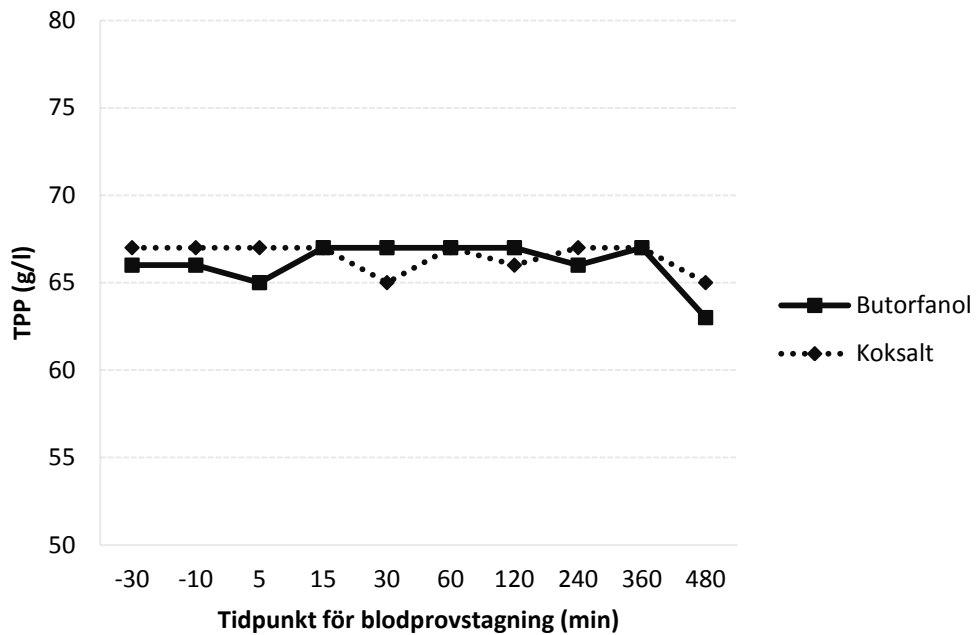
## Plommon



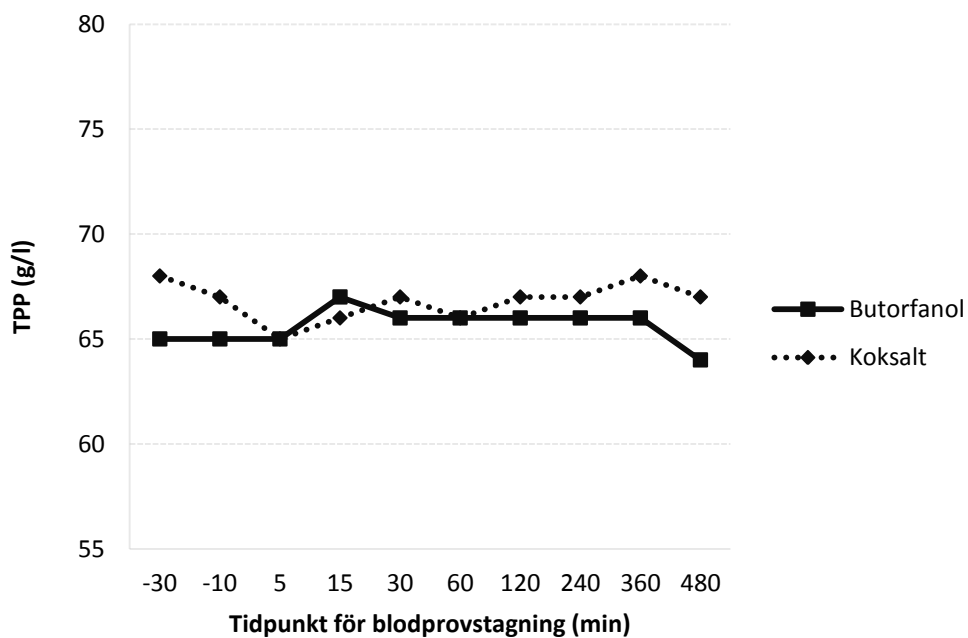
## Bilaga 2

Individkurvor för koncentration av totala plasmaprotein.

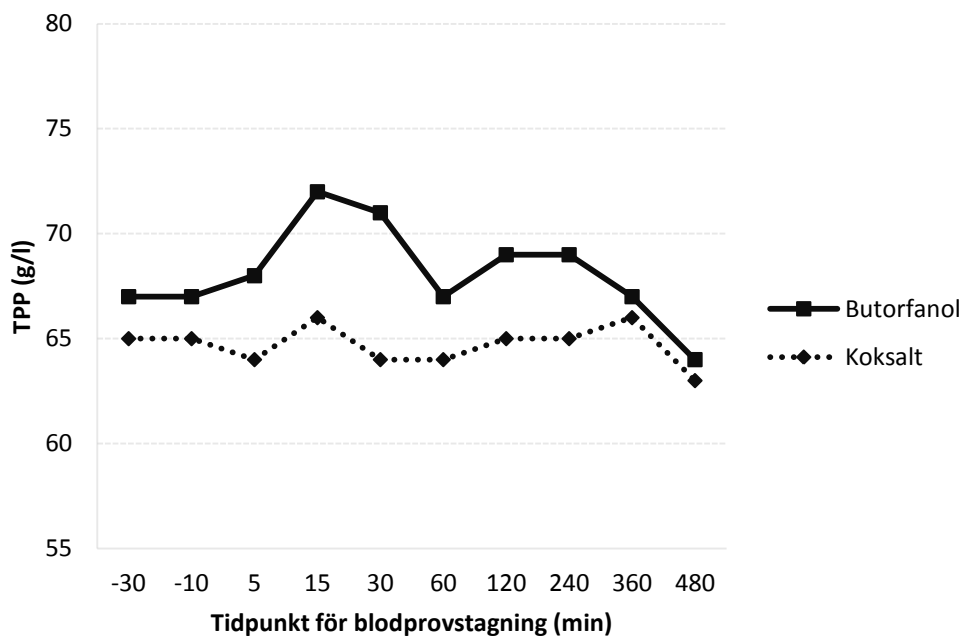
### Kiwi



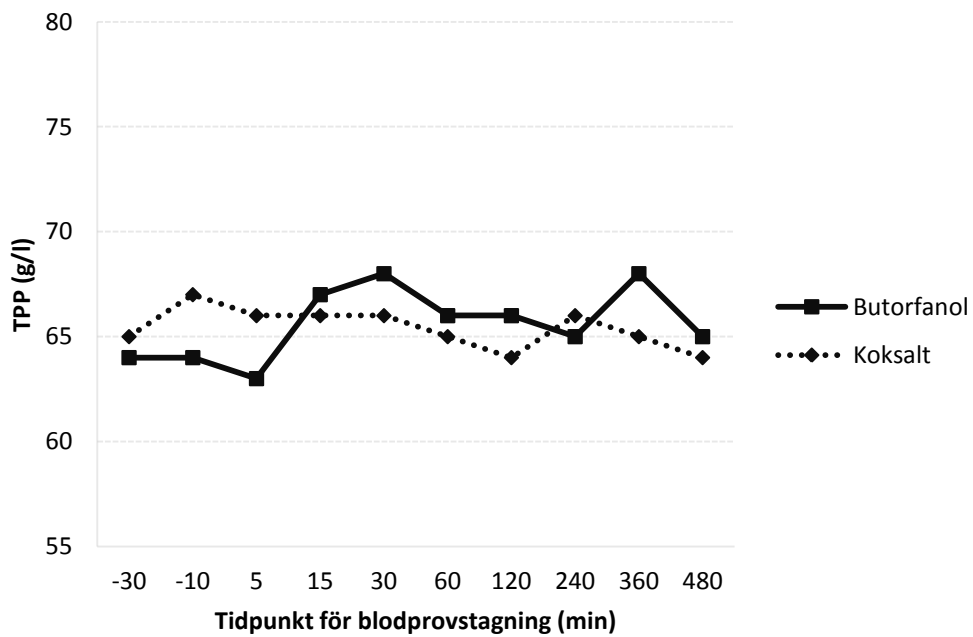
### Guava



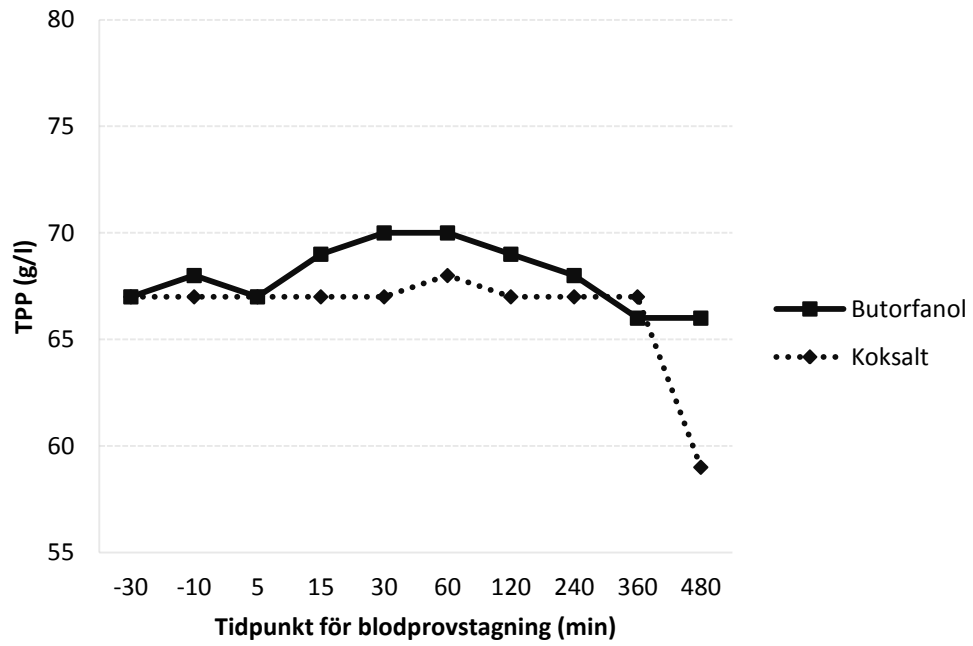
## Druva



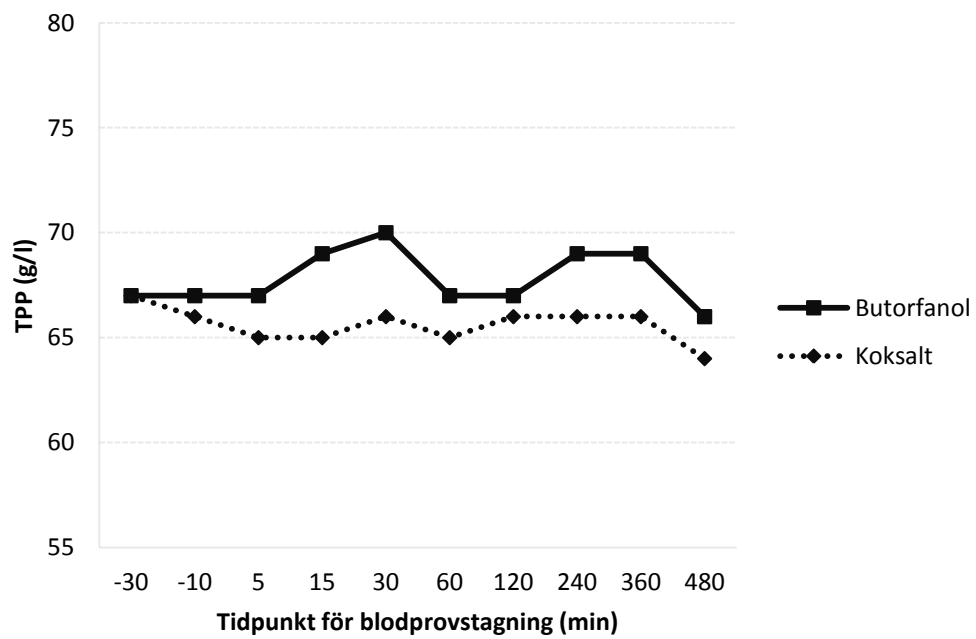
## Persika



## Sharon

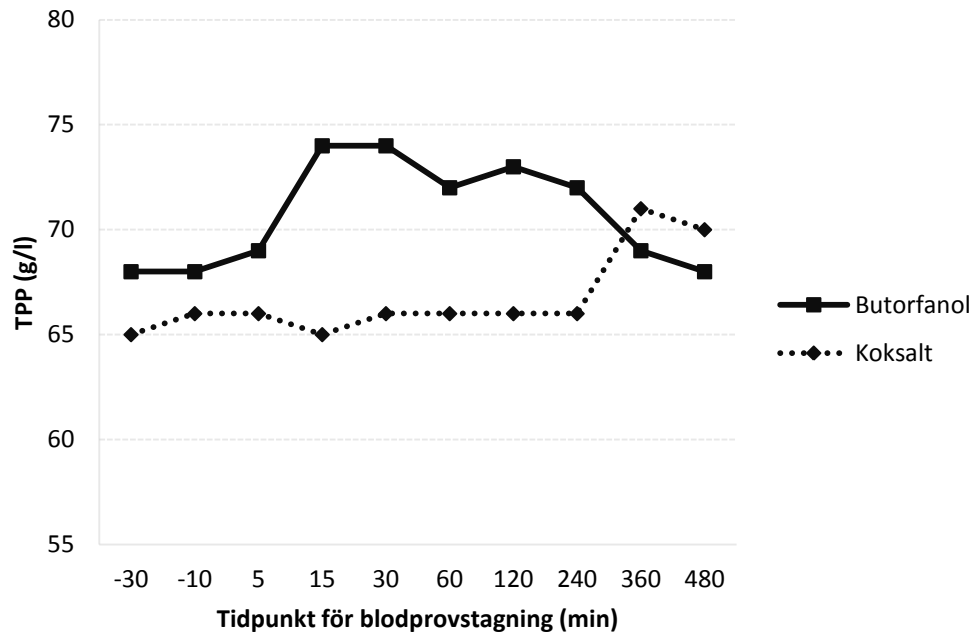


## Passion

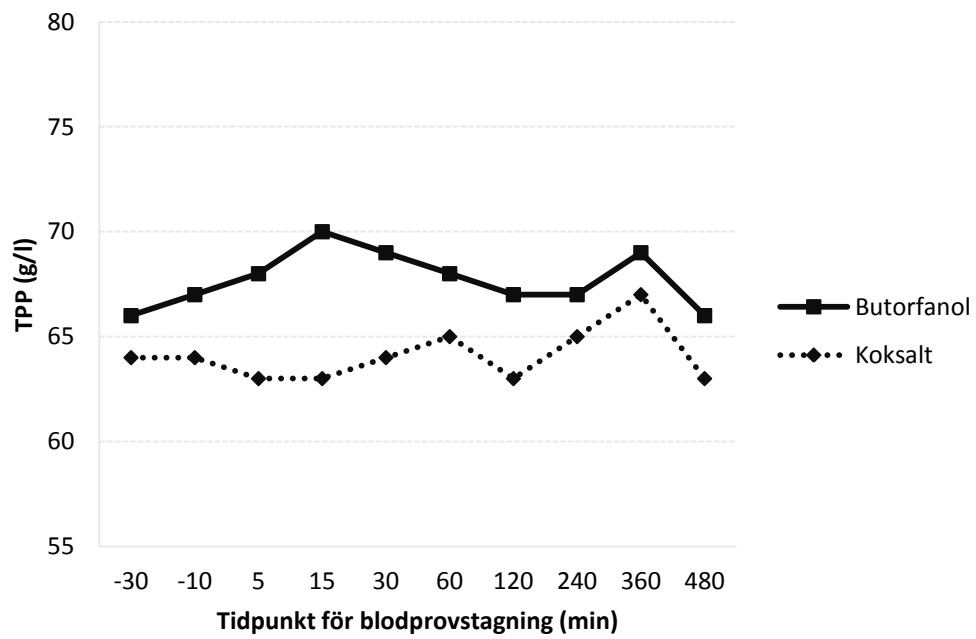




## Mango



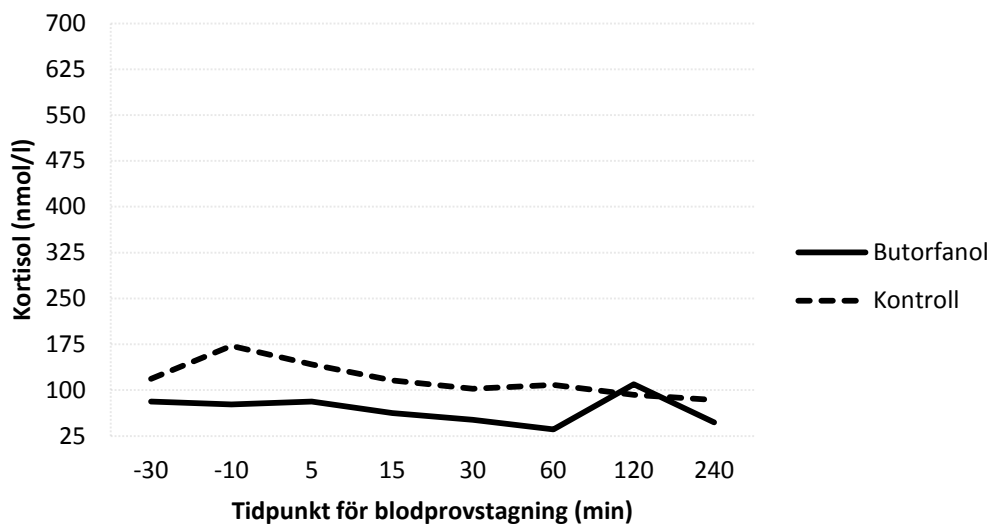
## Plommon



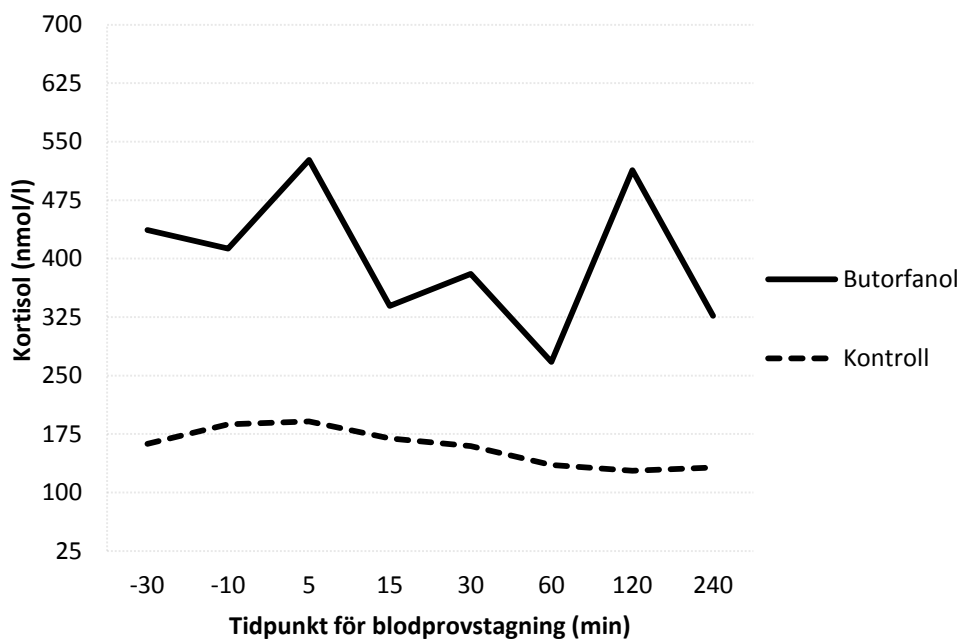
### Bilaga 3

Individkurvor för koncentration av kortisol.

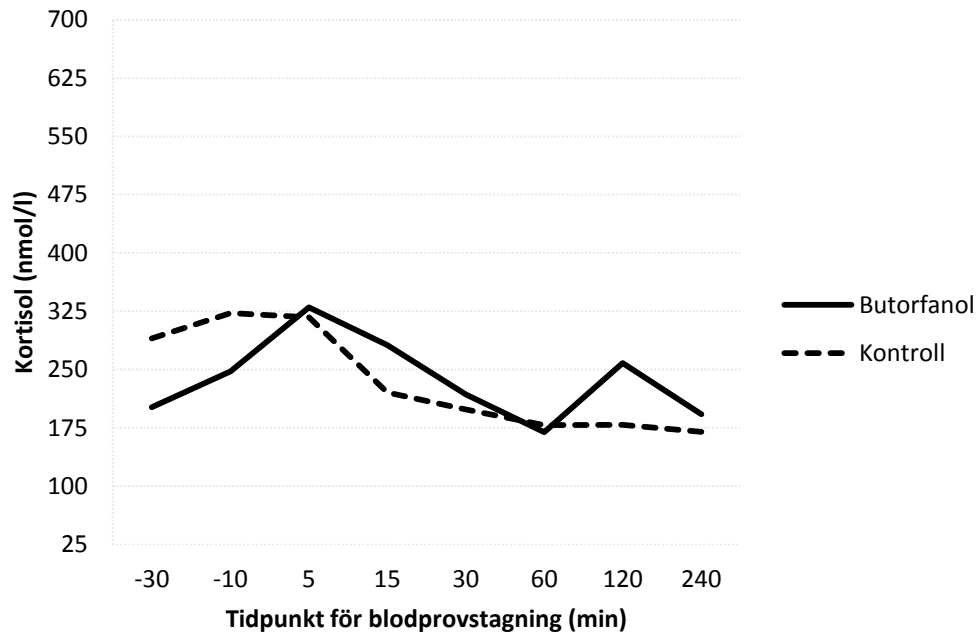
#### Kiwi



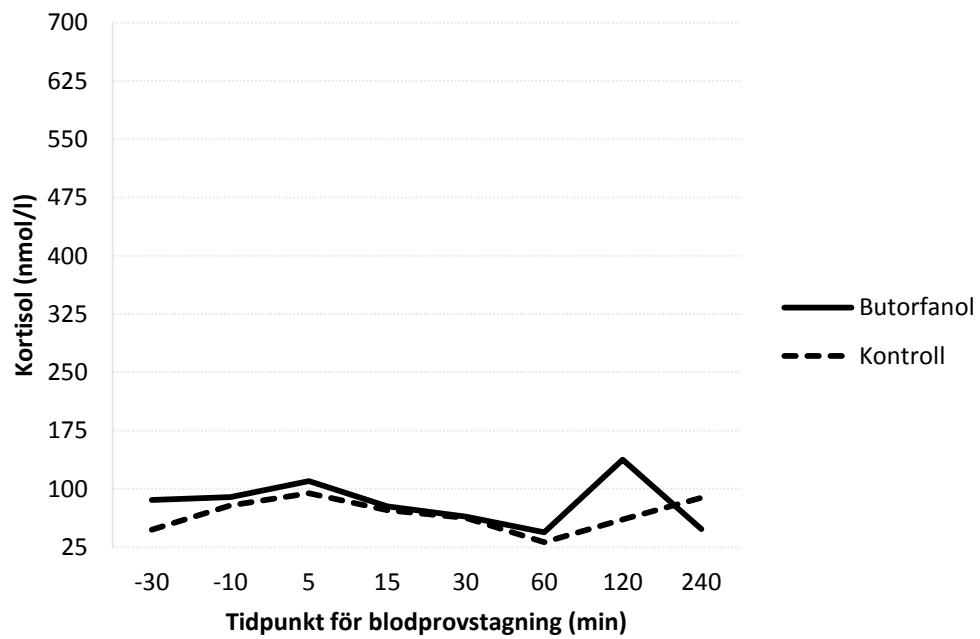
#### Guava



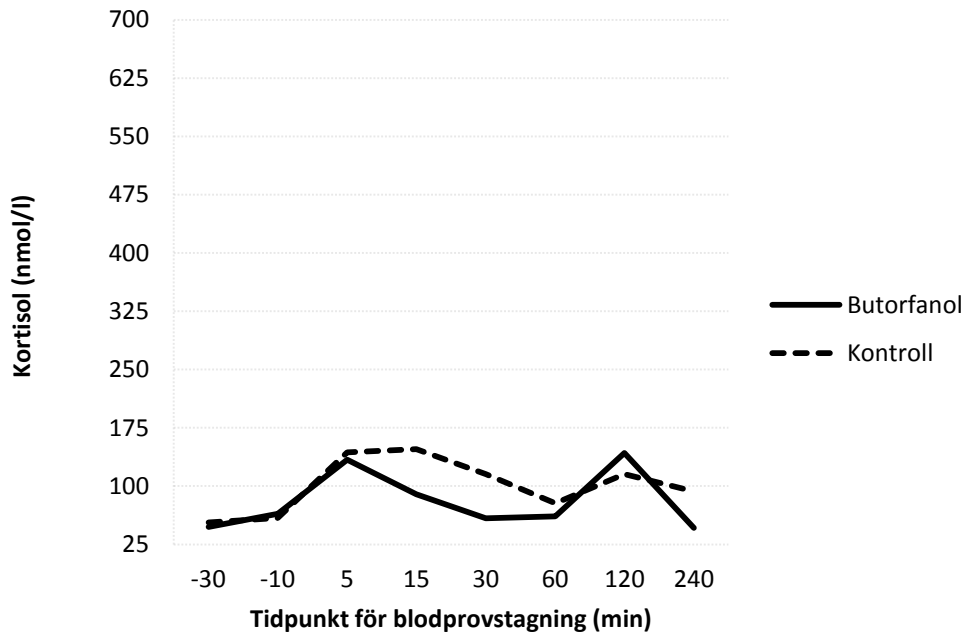
## Druva



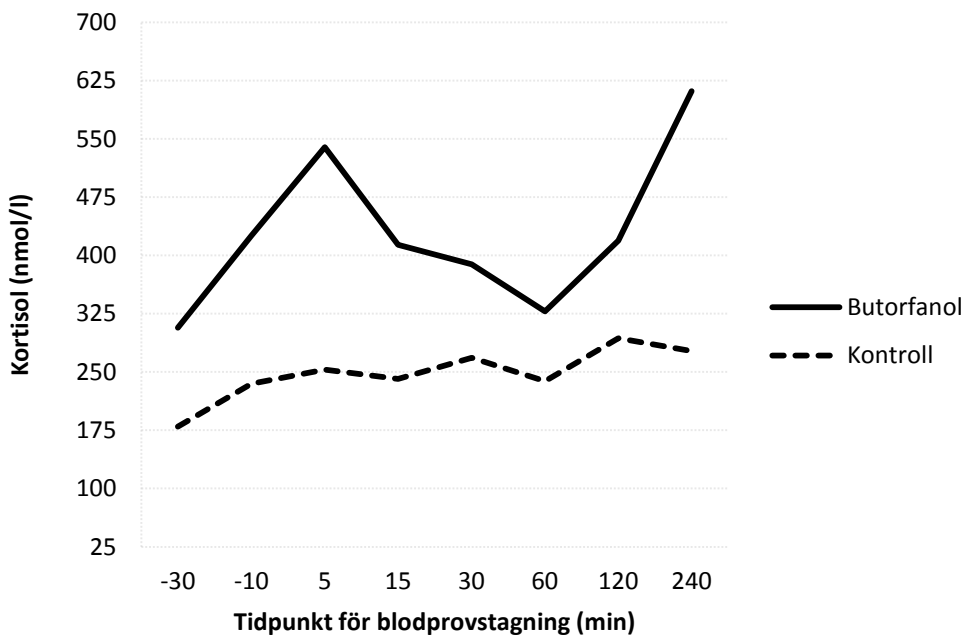
## Persika



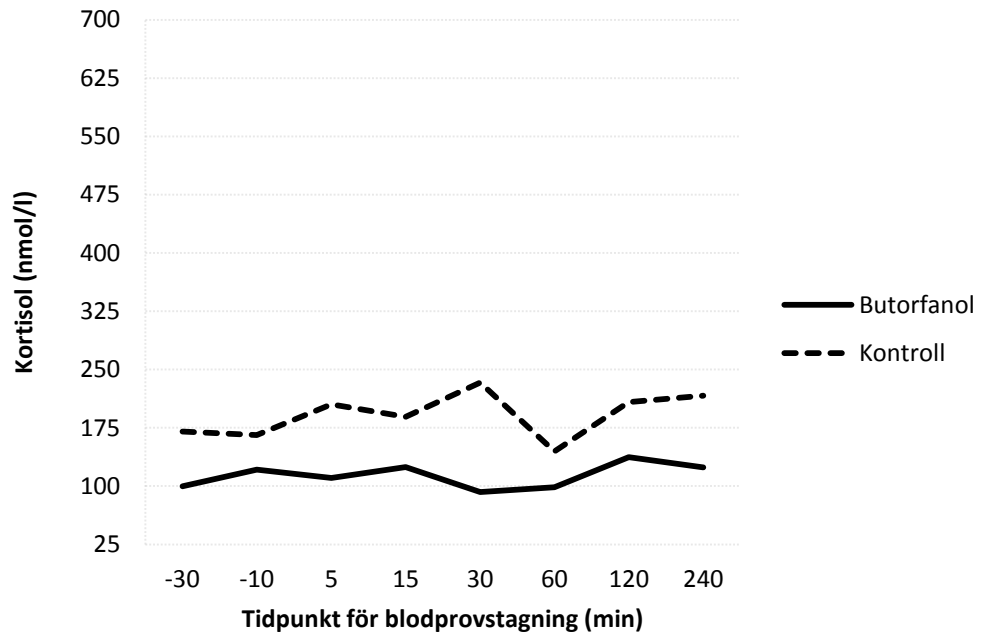
## Sharon



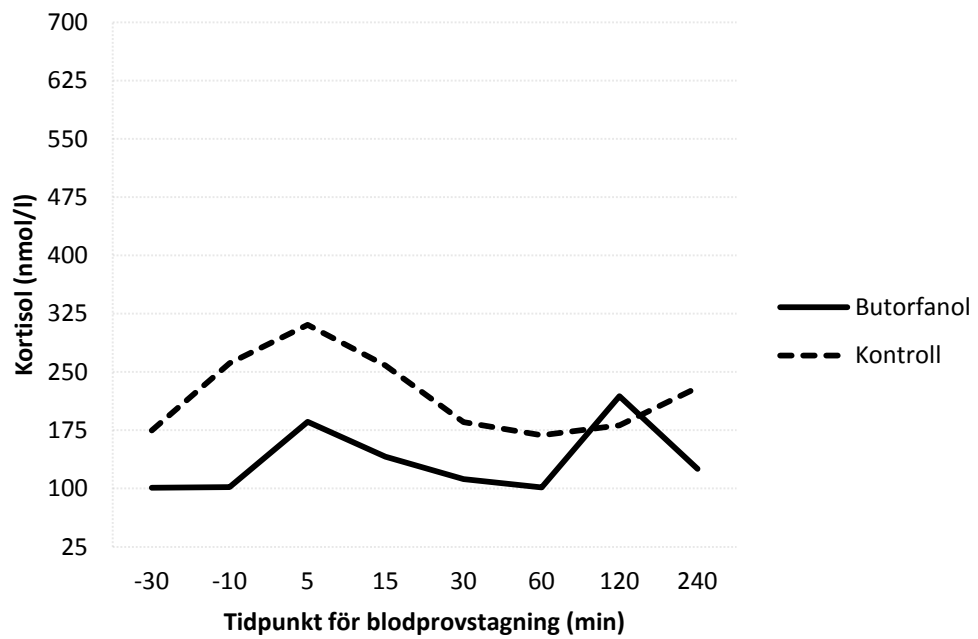
## Passion



## Mango

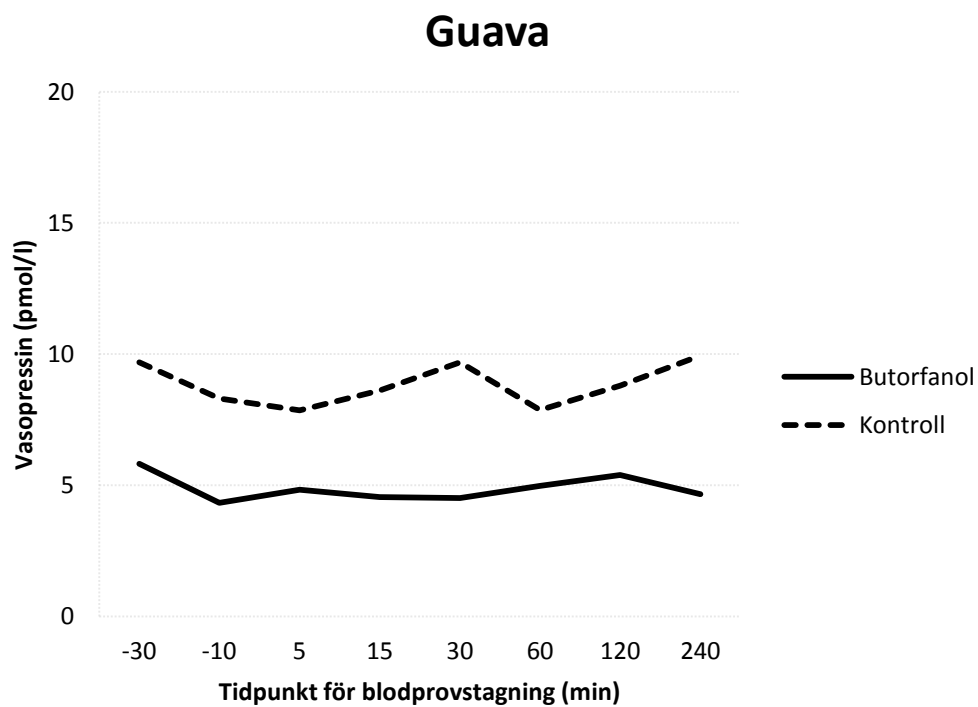
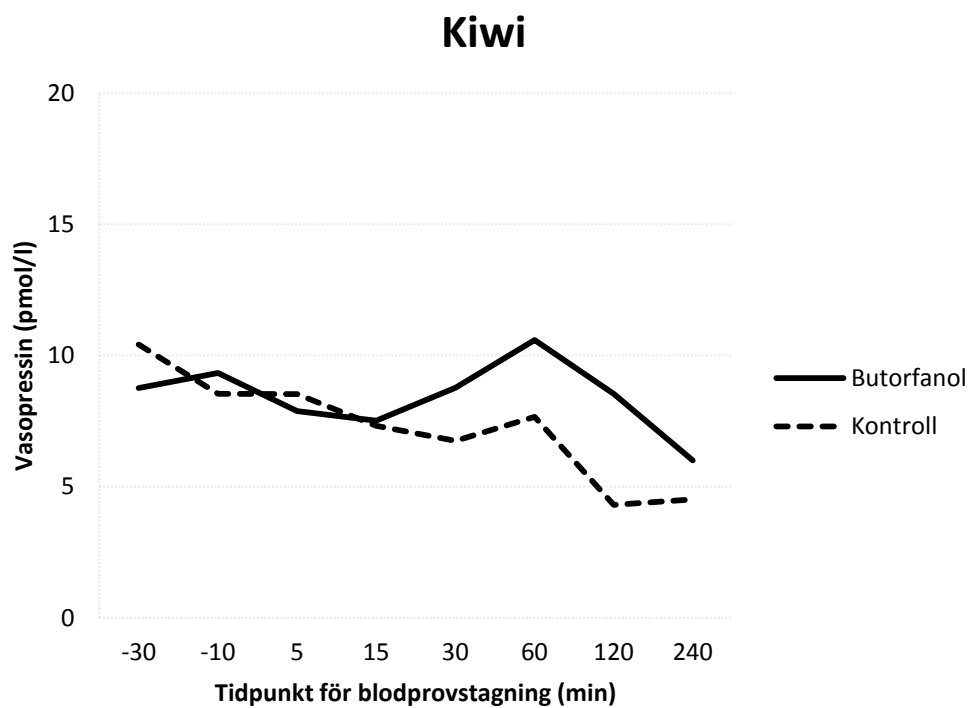


## Plommon

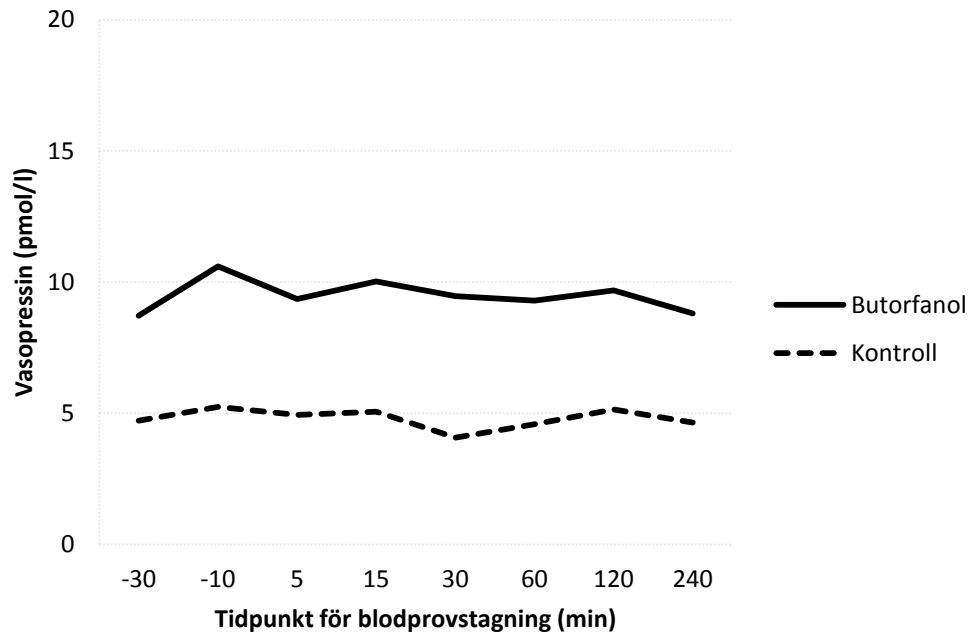


## Bilaga 4

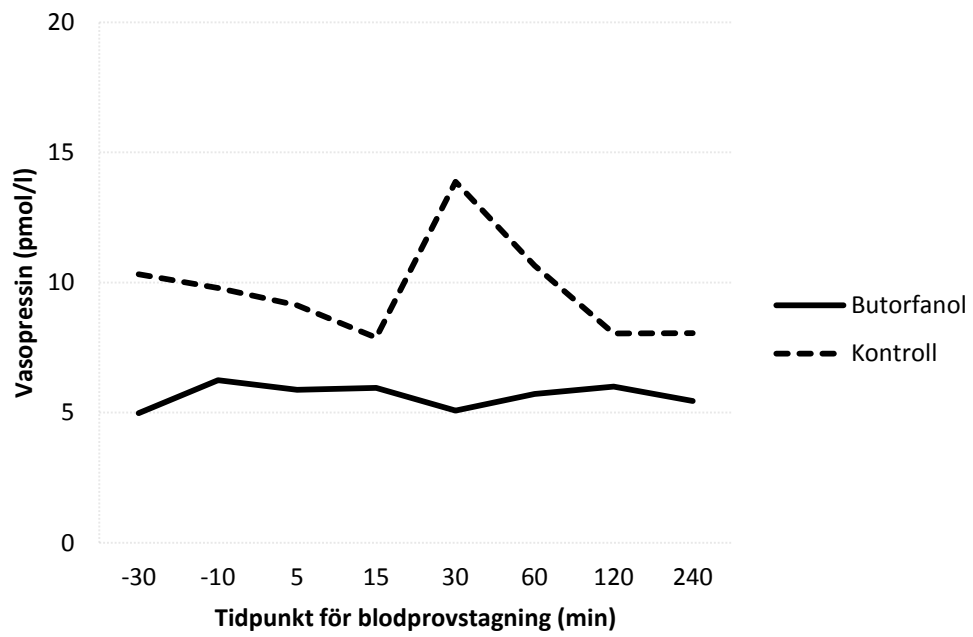
Individkurvor för koncentration av vasopressin.



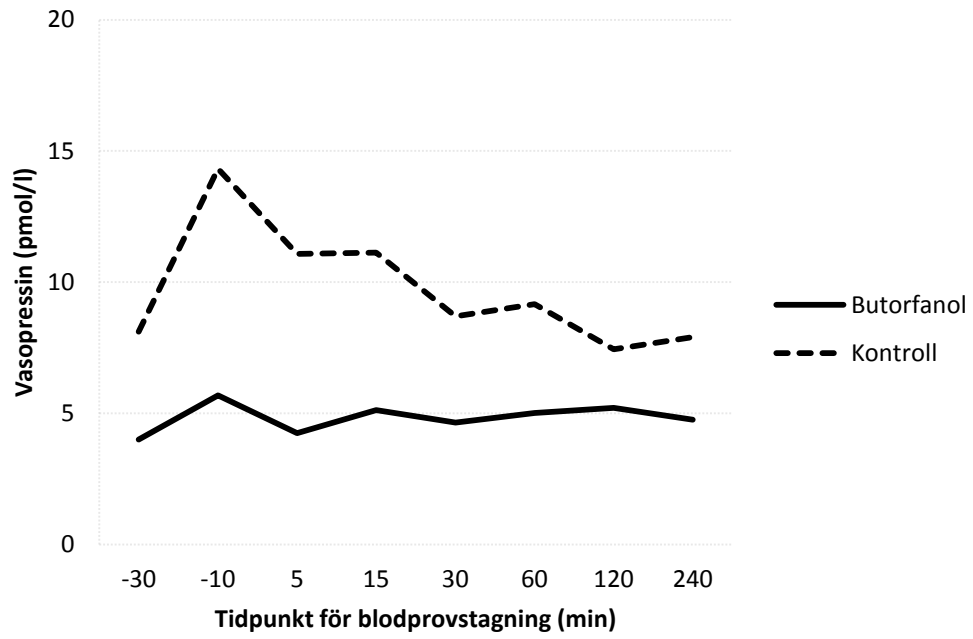
## Druva



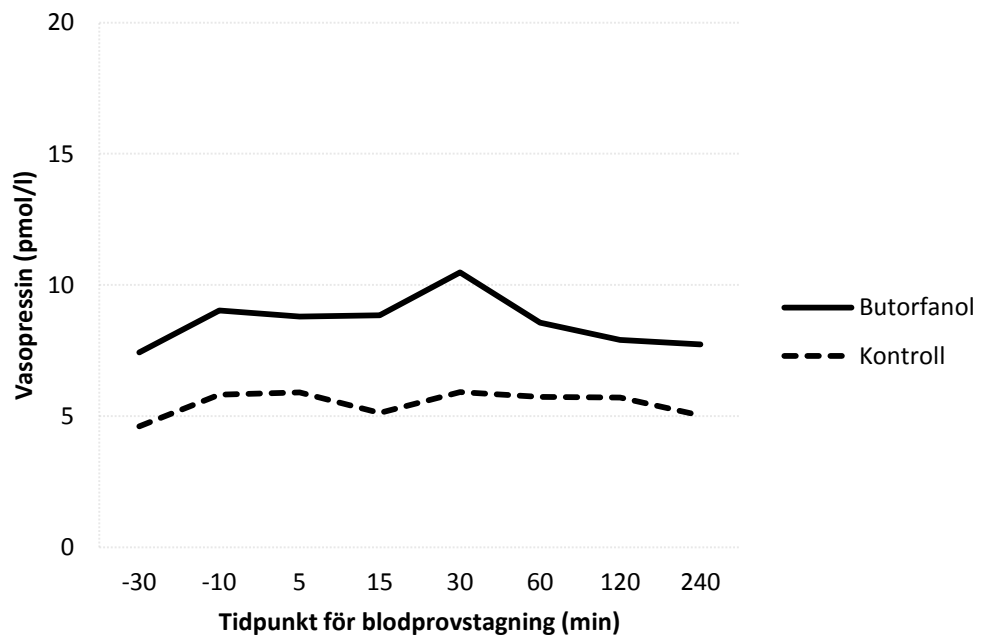
## Persika



## Sharon

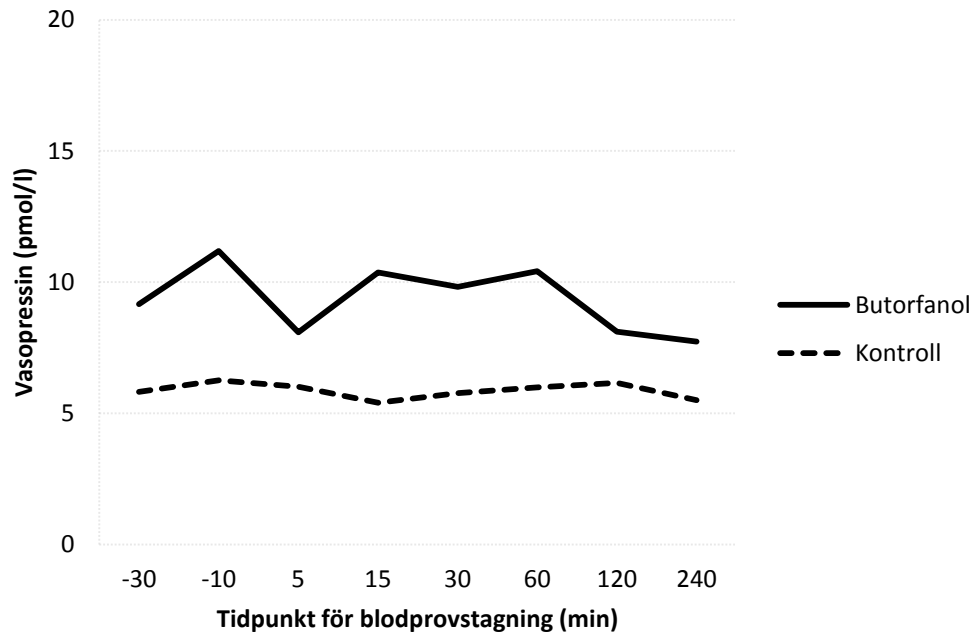


## Passion





## Mango



## Plommon

