



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Plasmakortisol som en indikator för stress under djurförsök på häst och hund

Matilda Backström

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:64*

Plasmakortisol som en indikator för stress under djurförsök hos häst och hund

Plasma cortisol as an indicator for stress during animal experiments including horses and dogs

Matilda Backström

Handledare: Carl Ekstrand, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Carina Ingvast Larsson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin, BVF

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0751

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Serietitel, nr: Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet 2016:64

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: kortisol, stress, djurförsök, studiedesign

Keywords: cortisol, stress, animal experiments, study design

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

SAMMANFATTNING

Djurförsök är en viktig del i medicinsk forskning och för att kunna undvika onödigt lidande och stress hos djuren måste metoder för att utvärdera detta finnas. Vid stress aktiveras det sympatiska nervsystemet och endogena substanser såsom kortisol frisätts i blodet. Kortisol är en ofta använd variabel för att mäta upplevd stress. Då kortisol kan påverkas av olika läkemedel måste det tas med i beaktningen då man använder kortisol för att bedöma huruvida djur i experimentiella studier utsatts för stress. I den här studien analyserades plasmakortisolkoncentrationer från djur i tre olika försök, varav två från djurslaget häst och ett från djurslaget hund, med avsikt att se om studiedesignen eller läkemedlen framkallat en stressrespons. Kortisolanalysen utfördes med ett kommersiellt ELISA-kit som är utvecklat för humant bruk och tidigare validerat för häst. En validering av analysmetoden för hund gjordes. Variationsvidden för proverna under valideringen var 27-86% vilket inte ger ett tillförlitligt resultat. Resultaten för hund redovisas därför ej i den här studien. Ingen av de analyserade proverna från häst hade kortisolkoncentrationer som var högre än normala kortisolkoncentrationer i plasma. Djuren i de här två studierna bedöms därför inte har utsatts för stress i den grad att plasmakortisol påverkats. Inte heller fanns någon statistisk signifikant skillnad ($p > 0,05$) mellan de jämförda läkemedelsbehandlingarna.

SUMMARY

Animal experiments is an important part of medical research and to avoid excessive suffering and stress methods for evaluating this must exist. The sympathetic nervous system activates under stress and endogenous substances such as cortisol is released into the blood. Cortisol is a frequently used variable to measure the experience of stress. Since cortisol can be affected by drugs this must be taken in account when analyzing cortisol as an indicator for stress. In this study cortisol in plasma collected from animals in three different experiments was analyzed, two including horses and one including dogs, to evaluate if the study design or injected drugs had subjected the animals to a stress response. The analysis was performed with a commercial ELISA-kit developed for human use and validated for horses. A validation of the analyze for dogs was also performed. The coefficient of variation was 27-86% and are considered not reliable results. The result from the study including dogs are therefore not shown. None of the samples that were analyzed had cortisol concentrations above normal limits. The animals included in these two experiments had not been exposed to stress in the extent that plasma cortisol was elevated. No statistical significant difference ($p > 0,05$) was seen between the compared drug treatments.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Kortisol	2
Kortisol hos häst och hund	3
Kortisol och läkemedel	4
MATERIAL OCH METODER	5
Penicillin häst	5
Dexametason häst	6
Cetirizin hund	7
Kortisolanalys	7
Statistik	8
RESULTAT	9
Validering hund	9
Totalexponering av kortisol	9
Penicillinförsöket, häst	10
Dexametasonförsöket, häst	11
DISKUSSION	12
TACK	15
REFERENSER	16

INLEDNING

Djurförsök är en viktig del av medicinsk forskning, både vid framställandet av läkemedel men även i vad som kallas grundforskning då biologiska processer undersöks och kartläggs. Men djurförsök inbegriper mer än detta. Studier som görs för att undersöka djurs beteende eller kartlägga populationer med hjälp av provfiske eller sändare är också djurförsök. I Sverige inkluderades 5 273 188 djur i försök 2012 enligt den svenska definitionen. Om man istället räknar efter den europeiska definitionen var antalet istället 262 148.¹ Den stora skillnaden i antal beror på att enligt den svenska djurskyddslagen (1988:534) räknas alla djur som används inom forskning som försöksdjur, även provfiske, medan EU:s försöksdjursdirektiv (2010/63/EU) omfattar bara de djur som utsätts för någon form av ingrepp i forskningssyfte.

Gemensamt för svensk och europeisk lagstiftning är att djur som används i försök skall utsättas för ett minimum av smärta, lidande och ångest. Det uppnås genom att djuren ska hållas i en för dem lämplig miljö samt att försökets betydelse skall vägas mot djurets lidande. Alla medlemsstater skall arbeta efter principen 3R, efter engelskans *replace, reduce, refine*, som innebär att hitta sätt att ersätta, minska och förfina försöken där förfina syftar till att "helt eliminera eller begränsa till ett minimum allt som kan vålla djuren smärta, lidande, ångest eller bestående men" (EU:s försöksdjursdirektiv 2010/63/EU).

Det finns tre huvudsakliga tillvägagångssätt för att utvärdera smärta hos djur. Det första är beteendeobservationer. Hälta, tandgnissling eller som hos hästar med kolik, kraftiga rullningar är vedertagna beteenden vid smärta (Radostis *et al.*, 2007). Metoder för bedömning av små förändringar i ansiktsuttryck som indikator för smärta, så kallat *Pain face* hos häst, mus och råtta (*Mouse Grimace Scale*, MGS, respektive *Rat Grimace Scale*, RGS), har utvecklats och delvis automatiserats (Langford *et al.*, 2010; Sotocinal *et al.*, 2011; Glerup *et al.*, 2015). En annan ofta använd metod är att mäta fysiologiska tecken på aktivering av det sympatiska nervsystemet. Ökad hjärtfrekvens, andningsfrekvens och svettningar är alla sådana variabler men kan vara svåra att tolka då till exempel hjärtfrekvens ökar både vid negativa och positiva upplevelser. Istället kan man mäta plasmakoncentrationer av de endogena substanser som indikerar aktivering av det sympatiska nervsystemet. Aktivering av sympaticus resulterar i ökade koncentrationer av adrenalin, noradrenalin, fria fettsyror och kortisol i blodet (Radostis *et al.*, 2007). Kortisol är en av de mest använda variablerna för att mäta upplevd stress och används vid experimentella och kliniska studier av flera vitt skilda djurslag till exempel fisk, kameldjur och fågel (Auperlin & Geslin 2008; Saeb *et al.*, 2010; Flament *et al.*, 2012; Hart, 2012).

I den här studien analyserades kortisol i plasmaprover från djur som deltagit i experimentella studier med olika studiedesign, under vilka de injicerats med olika läkemedel, med syfte att försöka utvärdera om detta framkallat en stressrespons.

¹ Användningen av försöksdjur i Sverige under 2012 RAPPORT 2013-10-21 Dnr: 31-3698/13

LITTERATURÖVERSIKT

För att kunna undvika stress och lidande hos djur måste det finnas sätt att upptäcka och bedöma det. Många studier har publicerats inom området men när det kommer till att utvärdera beteendet hos djuren är det fortfarande beroende av den subjektiva bedömning betraktaren av djuret gör (Hawkins 2002). I en rapport från 2011 beskriver JWGR, *Joint Working Group of Refinement*, ett tillvägagångssätt för hur välfärden hos försöksdjur kan bedömas. I rapporten finns en lång lista över indikatorer som kan bedömas exempelvis hull, hållning, pälskvalité och hur mycket tid djuret ägnar åt platsen för ett kirurgiskt ingrepp. Andra variabler som tas upp är kroppstemperatur, hjärtfrekvens och beteendeförändringar. Genom att innan varje försök etablera en standard för välfärd kan sådant som avviker uppmärksammas och eventuell orsak utredas. I samma rapport beskrivs vikten av att anpassa sin standard efter inte bara arten utan även efter eventuella genetiska modifieringar. Vid arbeten med försöksdjur är beteenden som cirkelgång vanligt förekommande hos individer som avlats med vestibulära förändringar. Hos andra grupper kan det vara ett stereotypt beteende beroende på miljö (Hawkins *et al.*, 2011).

Liknade standarder förekommer även i andra sammanhang exempelvis *Visual analog scale*, VAS, och olika former av *Glasgow Scale*, som ofta används under behandling och vid kliniska studier av hund och katt. (Aghighi *et al.*, 2012; Bortolami *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2013). Både VAS och *Glasgow Scale* är avsedda att bedöma smärta och används även om de är problematiska att validera då ingen ”gyllene standard” finns (Holton *et al.*, 2001; Hielm-Björkman *et al.*, 2011). Annan typ av stress bedöms ofta genom beteendeobservationer. Vanliga indikationer hos hund är vankande eller avsaknad av vila, skall och skakningar (Beerda *et al.*, 2000; Blackwell *et al.*, 2010; Kogan *et al.*, 2012). Observation och dokumentation av beteende är inte bara förenat med risk för subjektivitet utan också tidskrävande. Med avsikt att effektivisera men även minska risken för att feltolka har en delvis automatiserad metod för bedömning av RGS utvecklats. Mjukvaran *Rodent Face Finder*® identifierar öron och ögon på gnagaren och kan beskära bilder på endast gnagarens ansikte från videofilmer. Bilderna kan sedan importeras i Microsoft Powerpoint där de slumpas och kan bedömas av forskare med RGS som enda utgångspunkt. (Sotocinal *et al.*, 2011).

Att mäta mängden glukokortikoidhormon som cirkulerar i blod har flera fördelar. Eventuell bias som förekommer vid beteendeobservationer undviks och kortisolkoncentrationerna ökar vid alla former av stress så som smärta, sjukdom, hantering, transport och av miljöfaktorer. Frisättningen av kortisol regleras också på ett liknande sätt över djurslagsgränserna vilket gör att stressvaret på olika situationer kan jämföras mellan arter (Hart, 2012). Hos gnagare är det huvudsakliga glukokortikoidhormonet kortikosteron men reglering och frisättning sker på samma sätt som för kortisol (Atkinson & Waddell, 1997).

Kortisol

Kortisol är ett steroidhormon tillhörande gruppen glukokortikoider som produceras i och frisätts från binjurebaken. Hur mycket som frisätts regleras genom mängden ACTH, adrenokortikotropiskt hormon, i blodet. ACTH frisätts från hypofysen och regleras i sin tur av

två hormoner från hypothalamus, *corticotropin-releasing hormone*, CRH, och vasopressin, VP. Detta tre-stegsförlopp anges ofta som HPA-axeln, *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*.

Kortisol är ett väl känt stresshormon. När en individ upplever stress aktiveras det sympatiska nervsystemet och HPA-axeln. Kortisolnivåerna i blodet ökar inom några minuter. Kortisol är ett katabolt hormon vilket stimulerar glukoneogenesen. I det akuta skedet resulterar det i att fett- och proteinsyntes hämmas och mer glukos blir tillgängligt i blodet. Vid långvarig, kronisk, stress blir effekten en förlust av muskelmassa och hyperinsulinemi (Harris, 2014).

Mängden ACTH och kortisol som frisätts sker episodiskt i pulser under dygnet. Hos många dagaktiva djur är frisättningen som störst under morgontimmarna medan det hos nattaktiva djur är det motsatta (Rijnbeck & Kooistra, 2010).

Regleringen av ACTH och kortisolfrisättning sker på flera sätt. Förutom att ha en pulsatil frisättning påverkas ACTH av negativ *feedback*. Det finns receptorer för glukokortikoider både i hypothalamus som hämmar frisättningen CRH och VP samt i hypofysen som hämmar frisättning av ACTH.

Kortisol spelar även en viktig roll i immunförsvaret och har en antiinflammatorisk och immunosuppremerande funktion. Proinflammatoriska cytokiner, huvudsakligen IL-1 men även andra så som IL-6 och TNF α , påverkar HPA-axeln och ökar frisättningen av CRH. Dessa cytokiner hämmas sedan genom negativ *feedback* då kortisol blockerar cytokinproduktionen i makrofager. (Rijnbeck & Kooistra, 2010)

Kortisol hos häst och hund

Hästar har förutom den episodiska frisättningen av kortisol en tydlig dygnsrytm. Plasmakoncentrationerna är som högst under morgontimmarna och som lägst på kvällen. (Zolovick *et al.*, 1966; Bottoms *et al.*, 1972; Bohák *et al.*, 2012). Små föl tycks inte ha en variation över dygnet men en tydlig episodisk frisättning. Föl har en högre produktion av kortisol än vuxna hästar men totalkoncentrationen under ett dygn är signifikant lägre. Detta beror på att föl även har en högre kortisol-clearance än vuxna hästar vilket kan ha en klinisk betydelse vid behandling med kortisol (Hart *et al.*, 2012). Den episodiska frisättningen sker i pulser om ca 1 per timme och kortisolnivåerna i blodet har även störst fluktuation under den tid på dygnet då plasmakoncentrationerna ligger som högst. (Toutain *et al.*, 1998) Kortisolkoncentrationerna varierar även med årstiderna och är högre i maj än september på det norra halvklotet (Cordero *et al.*, 2012).

Hos hundar frisätts kortisol i pulser om 6-12 per dygn (Rijnbeck & Kooistra, 2010) men till skillnad från häst där en tydlig dygnsrytm är väl dokumenterad finns motstridiga rapporter om hund. Det har beskrivits att hundar uppvisat en rytm med högst koncentrationer av ACTH och kortisol under förmiddagen som sedan minskade under eftermiddagen. Dygnsvariationen var dock inte lika uttalad som hos människa vars dygnsrytm är väl dokumenterad (Kolevska *et al.*, 2003; Horvath *et al.*, 2007). Castillo *et al.* (2009) kartlade dygnsvariationen hos hund genom att mäta ACTH och kortisol varannan timme i en grupp av 11 friska hundar. De högsta koncentrationerna av ACTH och kortisol uppmättes på eftermiddagen för att sedan minska till kvällen. Skillnaden var dock inte stor nog för att vara statistiskt signifikant och de ökade

koncentrationerna sammanfaller med de tider då hundarna var som mest aktiva. Detta överensstämmer med tidigare studier som rapporterat att hundars dygnsvariation av kortisol istället är individuell och speglar perioder av aktivitet eller vila (Orth *et al.*, 1988; Castillo *et al.*, 2009).

Även rapporterna om huruvida ålder och kön påverkar kortisolnivåerna hos hund skiljer sig åt. Ingen skillnad i plasmakortisol kunde mätas hos hundar som befann sig före eller efter puberteten samt olika stadier av vuxenlivet (Stephen & Ledger 2004; Mongillo *et al.*, 2013). Mongillo *et al.* (2013) fann däremot att hanar uppvisar högre kortisolnivåer än tikar, i direkt kontrast till annan forskning som menar att det ej finns någon skillnad mellan könen (Hennessey *et al.*, 1997; Rosado *et al.*, 2010). Emellertid pekar resultaten från flertalet studier på att äldre hundar har högre ACTH och kortisolnivåer än yngre. Detta har förklarats med att antalet receptorer för glukokortikoider i hjärnan minskar med åldern vilket leder till ett sämre svar på negativ *feedback* (Reul *et al.*, 1991; Goy-Thollot, 2007).

Pituitary pars intermedia dysfunktion, PPID, är en neurodegenerativ sjukdom som förknippas med den åldrande hästen (Mc Farlane, 2007). I en studie som omfattade 340 hästar gjord i Australien var förekomsten av PPID 21,2% bland hästar över 15 år (McGowan *et al.*, 2013). Minskad dopaminproduktion leder till en förlust av hämmande signaler och en överproduktion av peptider från pars intermedia däribland ACTH. Resultatet blir stegrade plasmakoncentrationer av serotonin, melatonin och kortisol vilket resulterar i förlust av normal dygns-och årstidsvariation (Haritou *et al.*, 2008).

Plasmakortisol stegras vid alla typer av stress så som transport, sexuell upphetsning samt träning (Bacus *et al.*, 1990; Colborn *et al.*, 1991; Stull *et al.*, 2004; Mircean *et al.*, 2007). Det gör att den normala dygnsrytm som kortisol uppvisar mycket lätt rubbas och en så liten händelse som att flyttas innan provtagning kan påverka resultatet (Irvine och Alexander, 1994).

Enligt en studie som utfördes vid Veterinary Clinical Hospital i Murcia där 95 hästar med olika sjukdomstillstånd provtogs hade alla en signifikant stegring av plasmakortisol och ACTH oavsett orsaken till sjukhusvistelsen. Störst var stegringen hos hästar med akut sjukdom och fång. Minst stegring skedde i gruppen med kronisk smärta (Ayala *et al.*, 2012).

Kortisol och läkemedel

Kortisol används även som variabel för att utvärdera smärtlindring (Raekallio *et al.*, 1997; Möllenhoff *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2015). Detta trots att flera smärtstillande läkemedel i sig har en effekt på kortisolnivåerna. Opioider kan genom sin smärtstillande effekt blockera stimuli av HPA-axeln. Paradoxalt nog kan även HPA-axeln aktiveras genom de opioidreceptorer som finns i det centrala nervsystemet (Pechnick 1993). En ökning av plasmakortisol efter administrering av opioider finns beskrivet hos många djurslag däribland hund (Fox *et al.*, 1998; Ingvast-Larsson *et al.*, 2010) katt (Borrell & Borrell, 1977) och get (Ingvast-Larsson *et al.*, 2007). Nötkreatur däremot uppvisade en sänkning av plasmakortisol efter administrering av opioider medan administration av naloxan resulterade i höjda kortisolnivåer (Nanda *et al.*, 1992).

α_2 -agonister används inom veterinärmedicin för att sedera och smärtlindra patienter. Förutom dessa egenskaper tycks α_2 -agonister minska stress hos både människa och hund (Benson *et al.*, 2000; Scheemilch *et al.*, 2006). Det kan vara svårt att avgöra huruvida minskningen av kortisol beror på den minskning av stimuli som sederingen i sig ger eller om effekten beror på interaktioner med α_2 -receptorer vilka finns i hela det adrenerga systemet både centralt, perifert och i binjuremärgen (Lamont *et al.*, 2012). Medetomedin och dexdetomedin har dessutom en imidazol-del som har en hämmande effekt på frisättningen av steroider däribland kortisol (Jager *et al.*, 1998).

Bensodiazepiner till exempel diazepam används som premedicinering innan kirurgi på flera djurslag bland andra hund och häst (Voulgaris & Hofmeister, 2009; Psatha *et al.*, 2011). Hos kanin sjunker plasmakoncentrationen av kortikosteron signifikant om man ger diazepam tillsammans med adekvat smärtlindring innan kirurgi jämfört med endast smärtlindring. Det har tolkats som en effekt av att diazepam utövar en egen hämmande effekt på HPA-axeln. (Gonzales *et al.*, 2013).

Acepromazin är ett annat lugnande medel frekvent använt inom veterinärmedicinen. Det verkar genom att blockera α_1 -adrenoreceptorer och D₂-receptorer. α_1 -adrenoreceptor finns centralt i hypothalamus och stimulering har visat sig öka frisättningen av ACTH och cirkulerande kortisol hos människa medan α_1 -antagoniser isället orsakar en sänkning av kortisolkoncentrationer. (Al-Dumluji & Francis, 1993). Enbart acepromazin verkar inte ha tillräcklig effekt för att hämma kortisolstegringen om stresstimuli blir för stor (Freestone *et al.*, 1991; Bergeron *et al.*, 2002;).

Ytterligare studier på kanin indikerar att användning av ketamin ger en signifikant stegring av kortikosteroider i blodet. Ketamininjektioner kan vara smärtsamma och orsaka muskelnekrosor då de administreras intramuskulärt i kaniner och andra små djur. Genom att administrera god smärtlindring en tid innan injektionen kan man på så sätt minska stresstimuli av HPA-axeln (Gonzales-Gil *et al.*, 2015). En ökning av plasmakortisol efter intravenös administration av ketamin är dock beskrivet hos människa vilket tillskrivs ketamins sympatometiska effekt (Hergovich *et al.*, 2001).

MATERIAL OCH METODER

Plasma från tre olika försök, två på häst och ett på hund analyserades med avsikt att fastställa kortisolkoncentrationerna i proverna. Analyserna utfördes blindat för de olika behandlingarna.

Penicillin häst

Åtta hästar, tillhörande Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, Uppsala ingick i försöket. Hästarna var varmblodiga travare varav sju ston och en valack. Åldern var 13-23 år och vikten var 474 – 599 kg. Hästarna hölls i sin hemmiljö och utfodrades enligt sina vanliga rutiner, med ett visst tillskott av extra hö i samband med beteendeobservationer före och efter

injektionerna. De hölls i individuella boxar med automatiska vattenkoppar. Hästarna hade tillgång till daglig utevistelse i hage, utom den fjärde försöksdagen då de istället motionerades för hand.

Försöket gjordes i två omgångar med en *cross-overdesign*. I den första omgången slumpades varje häst att behandlas med antingen penicillin-prokain (Penovet® vet. Boehringer Ingelheim Vetmedica, Malmö, Sverige, 300 mg/ml.) eller en ny form av kombinationsbehandling med bensylpenicillin och lidokain, pc-lidokain. Pc-lido bereddes enligt följande: 3 gram bensylpenicillin (Bensylpenicillin® Meda, Meda, Solna, Sverige, innehåll: 3 g (5 milj IE) bensylpenicillinnatrium) löstes i 5 ml sterilt vatten (Sterilt vatten Fresenius Kabi, Fresenius Kabi, Uppsala, Sverige) och 5 ml lidokain med adrenalin (Xylokain® adrenalin, AstraZeneca, Södertälje, Sverige, lidokainhydroklorid 10 mg, adrenalin 5 µg). I andra omgången bytte hästarna preparat. Det tilläts gå 8 veckor mellan omgångarna. Hästarna medicinerades intramuskulärt i fyra dagar vid varje försökstillfälle. Injektionerna gjordes i halsmuskulaturen, omväxlande på höger och vänster sida. Blodprover togs innan varje injektion och 12 timmar efter. Efter försökets sista injektion togs prover efter 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24, 36 och 48 timmar. Tidpunkterna för blodprovstagning under försöket var timme 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 72,25, 72,5, 73, 74, 75, 77, 80, 84, 96, 108 och 120. Blodproverna vid tidpunkt 0 - 60 togs med vacutainer ur jugularvenen på motstående sida från den senaste injektionen. Dagen innan den sista injektionen anlades en permanent venkateter i ena sidans jugularven och därefter togs alla blodprover ur den. Alla blodprover togs i eller överfördes aseptiskt till förkylda heparinrör och förvarades i isvatten tills de centrifugerades (1500 g, 10 minuter, 4°C). Plasma avskildes till förkylda sterila plaströr och förvarades i -80°C tills de analyserades. Försöket är beskrivet genom personligt meddelande.²

Dexametason häst

Sex stycken varmblodiga travare, tre valacker och tre ston ingick i försöket. Åldern var 3-9 år och vikten var 429-550 kg. Hästarna höll i individuella boxar och utfodrades med hö och kraftfoder. De hade fri tillgång till vatten. Hästarna motionerades inte under försöket. Hästarna transporterades till platsen där studien utfördes två dagar innan försöken startade för att aklimatisera sig. Försöken gjordes i två omgångar med minst tre veckor mellan omgångarna under vilken tid hästarna vistades på bete.

Innan försöken startade klipptes pälsen över jugularvenen, huden tvättades och en permanent venkateter anlades. Päls klipptes även bort kranialt om karpus och tvättades som förberedelse för vardera arthrocentes.

En aseptisk ledinflammation inducerades genom att injicera lipopolysackarider utspätt i koksaltlösning (1ng/ml) i radio-karpaleden. Totalt injicerades en volym av 2 ml LPS-lösning vid tidpunkt 0. Två timmar efter LPS-injektionen gavs antingen 2 ml dexametason (Dexadreson spätt med 0.9 % koksaltlösning) eller 2 ml placebo i form av koksaltlösning som injektion i samma led. Alla hästar fick individuella doser av dexametason, 0.01 mg, 0.03 mg, 0.1 mg, 0.3 mg, 1 mg och 3 mg, volymen som injicerades uppgick dock alltid till 2 ml .

² Amelie Lind

Ledvätska och blod samlades vid tidpunkt 0 (innan injektion) och vid 2, 4, 6, 10, 24, 28, 32, 48, 52, 56, 72 samt 76 timmar. Tre ytterligare blodprover togs även 5, 20 och 40 minuter efter dexametason respektive placeboinjektionen. Inför varje ledvätskeprov utvärderades hälsa genom att hästarna travades 8 x 20 meter. Innan uppsamling av ledvätska bremsades hästarna för att förhindra plötsliga rörelser. Kylspray applicerades även på karpus precis innan ledpunktion med syfte att bedöva området. Blodproverna centrifugerades (1800g, 10 min) och plasman frystes till -20°C första dygnet för att sedan förvaras i -80°C. Ledvätskan centrifugerades i 5 minuter (1800g) innan den frysförvarades på samma sätt som plasman. Försöket är beskrivet genom personligt meddelande.³

Cetirizin hund

Åtta stycken destinationsuppfödda försöks- och undervisningshundar tillhörande Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, Uppsala ingick i försöket. Åldern var 4-7 år och vikten var 10,5-13,5 kg. Hundarna hölls i deras hemmiljö, fyra hundar i varje rum med tillgång till utevistelse i rastgård dagtid. Utfodring skedde varje morgon och de hade fri tillgång till vatten dygnet runt. Alla hundarna var tikar av rasen beagle.

Hundarna klipptes med klippmaskin på ett ca 20 x 30 cm stort område lateroventralt på vardera sidan av thorax som förberedelse inför intrademala injektioner. Varje hund gavs två intradermala injektioner med histaminlösning (0,1mg/ml) vid tidpunkt, 0,24, 48, 50, 51, 52, 55, 57, 59, 72, 76, 81 och 96h under varje försöksomgång. Histaminlösningen bereddes genom att späda histaminlösning med styrkan 10 mg/ml (Soluprick positiv kontroll, ALK Nordic AS, Kungsbacka, Sverige) i 0,9 % koksaltlösning (Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige). Volymen var 0,07 ml histaminlösning (0,7 µg histamin per injektion). Som negativ kontroll användes identisk volym koksaltlösning som injicerades intradermalt. Efter 15 minuter lades hundarna på sidan och storleken på de histamininduerade kvaddlarna mättes med ett digitalt skjutmått. Blodprov togs efter varje injektion. Proverna förvarades på is tills de centrifugerades (1500g, 10 minuter, 4°C) och plasman förvarades sedan i -80°C. Hundarna medicinerades även *per os* vid tre tillfällen, tidpunkt 0, 24 och 48h. Varje hund fick antingen en köttbulle innehållande cetirizin eller placebo, vilket utgjordes av endast en köttbulle, under vardera försöksomgång. Under omgång 1 fick fyra av hundarna 4 mg/kg cetirizin och fyra av hundarna placebo *per os* var 24:e timme. Under omgång 2 spegelvändes behandlingen, dosen sänktes och hundarna fick som aktiv behandling 4 mg/kg cetirizin som startdos och 2 mg/kg cetirizin som underhållsdos efter 24 och 48 h. Det tilläts gå tre månader mellan omgångarna. Hundarna filmades även 1,5-2,5 och 3-4,5 timma efter läkemedelsgeva dag 1 och 2 med avsikt att studera deras beteende (Hanson, 2015; Norlander, 2015).

Kortisolanalys

Plasmakortisolnivåerna analyserades med en immunologisk metod, *Enzyme Linked Immunosorbent assay*, ELISA. ELISA-kitet som användes (Demeditec Kiel, Tyskland) är utvecklat för humant bruk och är tidigare validerad för häst. (Bohman, 2013).

³ Carl Ekstrand

För proverna från häst följdes tillverkarens arbetsgång. Plasman tinades på is och ELISA-kitet tilläts anta rumstemperatur innan analysen påbörjades. Av vardera standard och prov pipetterades sedan 20µl i parade brunnar. Till varje brunn tillsattes 200µL enzymkonjugat som sedan blandades grundligt. Plattan inkuberades i 60 minuter i rumstemperatur innan innehållet skakades ur. Brunnarna tvättades därefter fyra gånger med 300µL tvättlösning som dekanterades mellan varje omgång. Kvarvarande droppar avlägsnades genom att slå plattan mot absorberande papper. Till varje brunn tillfördes sedan 100µL substrat varpå ytterligare inkubation i 15 minuter utfördes. Därefter tillsattes stopp-lösning. Absorbansen mättes inom 10 minuter efter tillsättandet av stopplösning i 450 nm (Wallac Victor², 1420 Multilabel Counter, Wallac Sverige AB).

För proverna från hund var det inte möjligt att direkt applicera plasma till ELISA-kitet. Istället behövde plasman behandlas innan analysen för att extrahera steroiderna för att undvika falskt negativa resultat. Det skedde medelst ett protokoll från leverantören av ELISA-kitet. Proceduren i korthet:

1ml ethylacetat pipetterades över i 1,5 ml rör, ett motsvarande varje prov. 100 µl av provet tillsattes och blandades i drygt 2 minuter på en vortexer. Rören centrifugerades sedan hastigt (1 minut 1100g) för att få en tydlig separation mellan faserna. Proven placerades i frysen, -80°C över natten.

Nästa dag hälldes vätskefasen försiktigt över i ett nytt rör utan att något av det frusna materialet tilläts följa med. Lösningen fick sedan indunsta vid en temperatur på 70°C. Ethylacetat kokar vid 77°C vilket inte får uppnås. När all vätska indunstat tillsattes 100 µl av 0-standarderna från ELISA-kitet för att lösa de kvarvarande steroiderna. Proven vortexades hastigt innan analysen påbörjades. Därefter sattes proven till kitet som kördes enligt tillverkarens rekommendationer.

En standardkurva för varje platta och kortisolkoncentrationen i varje prov beräknades med onlineverktyget "Four parameter logistic fit" MyAssays Ltd., 3:e November 2015.

Analysegenskaper

Enligt tillverkaren är kvantifieringsspannet för Elisa-plattan mellan 20-800 ng/mL. Korsreaktiviteten inom analysen för följande steroider var: Kortisol 100%, Kortikosteron 45%, Progesteron <9 % Deoxycortisol < 2% Dexametason < 2% Östriol <0.01% Estron <0.01%, Testosteron <0.01%. Variationsvidden (CV%) inom en platta är mellan 3,2-8,1% och mellan plattor 6,5-7,5%.

Elisa-plattan är som tidigare beskrivet validerad för häst. Kvantifieringsspannet var 20-800 ng/mL och variationsvidden 0,2-14,8% (Bohman, 2013).

Statistik

För att mäta totalexponeringen av kortisol under försöken räknades ytan under kurvan (AUC) ut med trapetsmetoden för varje behandlingsomgång. Även medelvärden och standardavvikelse räknades ut i Microsoft Excel 2015. (Microsoft Corporation). Den statistiska analysen gjordes med ett Mann-Whitney test då proverna inte kunde antas vara

normalfördelade i mjukvaran Minitab® 17.1 (Minitab® Statistical Software, 2010 Minitab Inc., USA). Statistiskt signifikant skillnad ansågs föreligga om $p < 0,05$.

RESULTAT

Validering hund

För att validera analysmetoden för hund analyserades prov från fem av hundarna i fem multiplikater. Fyra extra parade brunnar från ett prov från vardera av de fem hundarna analyserades för att därefter beräkna medelvärde, standardavvikelse (SD) samt variationskoefficient (CV%) för proven. Resultaten visas i tabell 1. Från två av proven är antalet multiplikater endast 4 på grund av analysproblem.

Tabell 1

Prov	n	SD	Medel (ng/ml)	CV%
1	5	4,80	16,29	29
2	5	3,30	11,82	27
3	5	17,61	2,35	86
4	4	11,73	28,25	41
5	4	8,00	12,31	65

För att kontrollera variationen mellan plattorna samt kvalitén på metodens utförande så jämfördes standardkoncentrationerna i spädningsmedium från de fem plattor som användes för validering. Resultaten visas i tabell 2.

Tabell 2

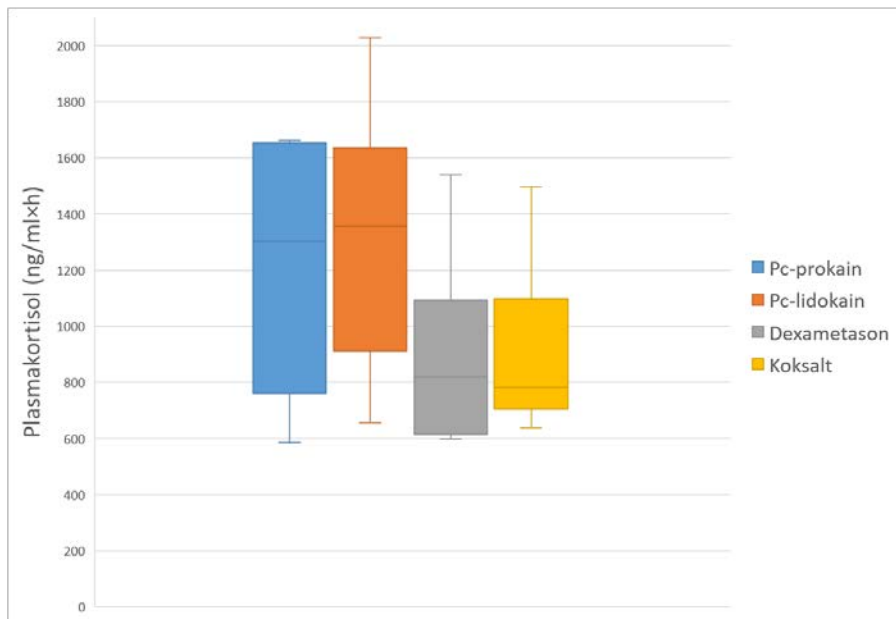
Standard konc. (ng/ml)	n	SD	Medel (ng/ml)	CV%
20	5	0,44	19,85	2,2
50	5	2,62	51,95	5,0
100	5	6,94	96,55	7,2
200	5	16,84	208,98	8,1
400	5	12,16	392,13	3,1
800	5	23,44	820,85	2,9

Totalexponering av kortisol.

Den totala exponeringen av kortisol för hästarna som innefattades i försöken med penicillin var mellan 585,47 ng/ml×h och 1660,98 ng/ml×h under försöksomgången med pc-prokain.

Under försöksomgången med pc-lidokain varierade totalexponeringen mellan 657,03 ng/ml×h och 2027,63 ng/ml×h. I försöket med intrartikulära injektioner av dexametason var totalexponeringen av kortisol mellan 597,78 ng/ml×h och 1540,07 ng/ml×h. Då koksaltlösning injicerades i leden varierade totalexponeringen mellan 727,15 ng/ml×h och 1496,77 ng/ml×h. (Figur 1). Penicillinförsöket pågick under 120 timmar medan dexametasonförsöket pågick under 76 timmar för varje behandlingsomgång.

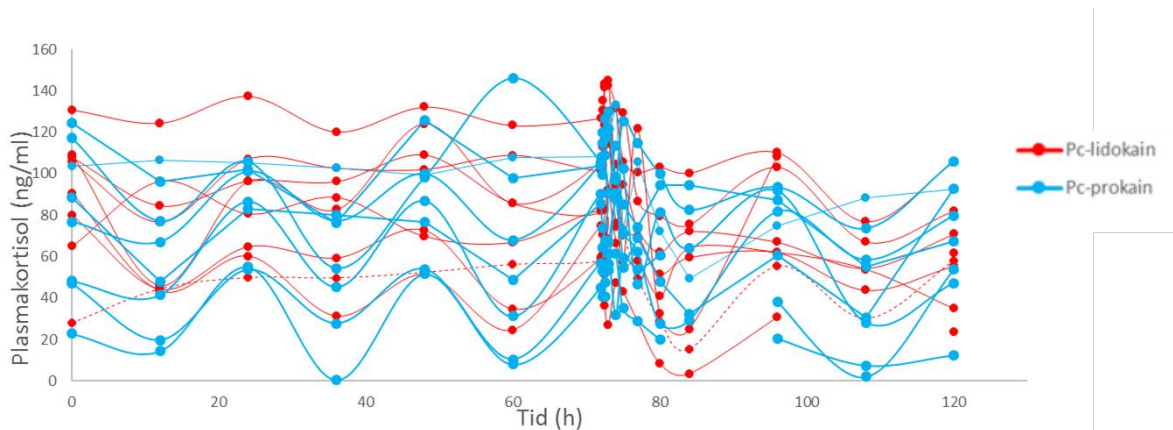
På grund av analysmetodens stora osäkerhet gällande kortisolkoncentration i hundplasma redovisas inte de resultaten.



Figur 1. Totalexponering av plasmakortisol under två olika experimentella studier där varje individ deltog i två försöksomgångar med olika behandlingar. Lådorna representerar percentil 25 till 75. Variationsvidden illustreras av felstaplar och medianvärdet av horisontella linjer. Penicillinförsöket pågick under 120 timmar och dexametasonförsöket pågick under 76 timmar.

Penicillinförsöket, häst

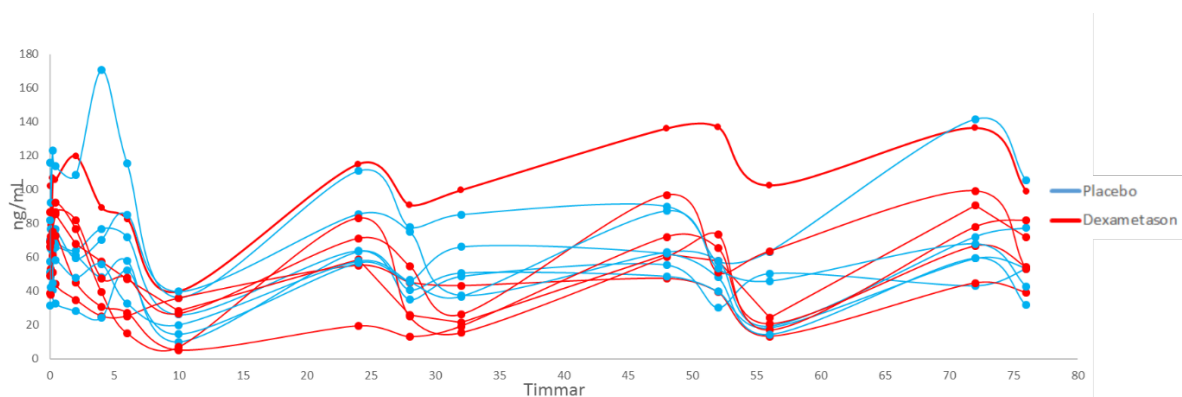
Ingen statistiskt signifikant skillnad i totalexponeringen av kortisol kunde ses mellan de olika behandlingarna. Hästarna visade en stor individuell variation med totalexponeringsnivåer mellan 585 ng/ml×h och 2027 ng/ml×h. Kortisolkoncentrationerna tenderar att vara lägre efter timme 72 då en permanent venkateter anlades, skillnaden är dock inte stor nog för att vara statistiskt signifikant. Vid en inspektion av de individuella kortisol-tidsförloppen noteras att häst nummer 5 inte har en tydlig dygnsrytm under pc-lidokain omgången förrän en permanent venkateter anlagts. Figur 2.



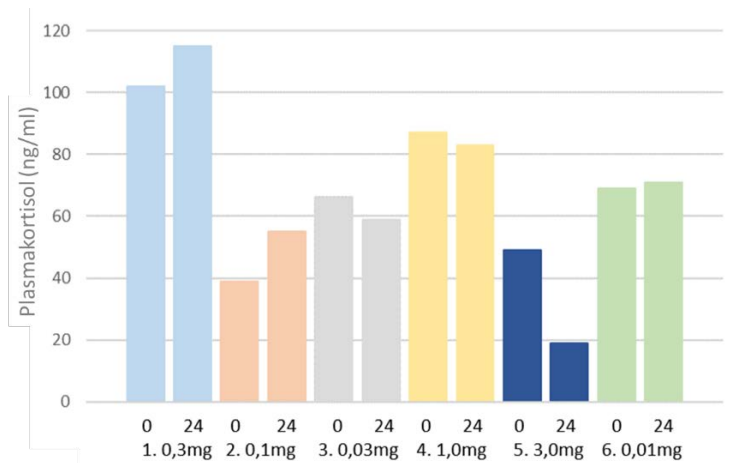
Figur 2. Plasmakortisolnivåer hos 8 hästar behandlade med pc-lidokain samt pc-prokain. De fyllda cirkelarna illustrerar tiden för blodprover. Häst nummer 5 (streckad linje) har ej en tydlig dygnsrytm förrän efter timme 72. Ingen statistiskt signifikant skillnad fanns mellan behandlingarna ($p > 0,05$).

Dexametasonförsöket, häst

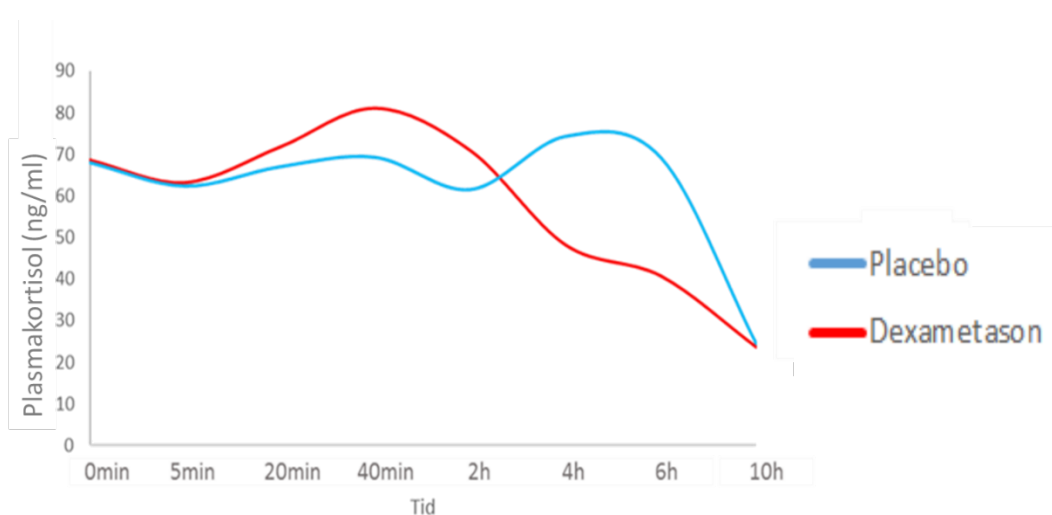
Total exponering av kortisol under försöket var mellan $598 \text{ ng/ml} \times \text{h}$ och $1540 \text{ ng/ml} \times \text{h}$. En tydlig dygnsrytm med högre koncentrationer på morgonen och lägre under eftermiddagen bevarades oavsett behandling vilket framgår av figur 3. Vid en individuell jämförelse framgår att häst 5, som utsattes för den högsta dosen dexametason inte bara får de lägsta kortisolkoncentrationerna det första dygnet utan även har de minsta variationerna under samma tid (Figur 3). Då alla hästar utsattes för individuella doser samt en stor dygnsvariation föreligger jämfördes 0-provet innan behandling med dexametason med provet taget vid timme 24. Hos häst nummer 5 kvarstår då en hämning av plasmakortisol med en kortisolkoncentration av 19 ng/ml jämfört med 49 ng/ml innan behandling (Figur 4). Medelvärden av kortisolkoncentrationerna de första 10 timmarna efter injektion av läkemedel eller placebo beräknades och en tendens till sänkning av kortisolkoncentrationerna kan ses vid fyra och sex timmar hos de hästar som fått dexametason i jämförelse med de som enbart fått koksalt (Figur 5).



Figur 3. Plasmakortisolnivåer under 76 timmar hos hästar behandlade med dexametason respektive placebo. De fyllda cirkelarna illustrerar tiden för blodprover. Häst nummer 5 (streckad linje) har exponerats för den högsta dosen dexametason och uppvisar lägst kortisolnivåer under det första dygnet. Den naturliga dygnsvariation som är tydlig hos de andra hästarna saknas också hos häst 5 det första dygnet.



Figur 4. Plasmakortisol (ng/ml) hos 6 hästar innan intraartikulär behandling med dexametason, tidpunkt 0, jämfört med 24 timmar senare, tidpunkt 24. De individuella doserna som injicerades står efter hästens nummer. Endast hos häst nummer 5 kan en hämning av plasmakortisol ses.



Figur 5. Medelkoncentration av plasmakortisol hos 6 hästar de första 10 timmarna efter injektion av dexametason respektive placebo.

DISKUSSION

Att kunna bedöma smärta eller stress hos ett djur är av stor vikt inte bara i kliniska sammanhang utan även vid experimentella studier. Mätning av mängden kortisol i blodet är ett sätt att försöka göra det objektivt. Dessvärre finns det även när det gäller kortisol stort utrymme för att feltolka resultaten. Stimuli av HPA-axeln och en frisättning av kortisol till blodet är en fysiologisk reaktion på all sorts stress vilket är viktigt att ta med i bedömningen. (Bacus *et al.*, 1990; Colborn *et al.*, 1991; Stull *et al.*, 2004; Mircean *et al.*, 2007; Ayala *et al.*, 2012). Försöksdjuren bör hållas i en för dem så vanlig miljö som möjligt. Ålder och säsong är andra faktorer som påverkar kortisolnivåerna. Om det är stor åldersspridning inom gruppen

eller proverna tagna vid olika årstider blir resultaten svårare att bedöma. (Cordero *et al.*, 2012; Hart *et al.*, 2012). En annan aspekt är den pulsatila frisättningen samt förekomsten av en dygnsrytm hos djuren. Den pulsatila frisättningen gör att kortisolnivåerna hos en individ kan förändras med mycket kort mellanrum. Hos djurslag med en uttalad dygnsrytm är det viktigt att alla prov tas vid samma tidpunkt på dygnet för att undvika felaktiga tolkningar (Zolovick *et al.*, 1966; Bottoms *et al.*, 1972; Bohák *et al.*, 2012).

Förutom alla dessa aspekter i bedömningen av resultaten från de tre ovan beskrivna studierna måste analysmetoden utvärderas. Elisa- kiten som användes var tillverkat för humant bruk och tidigare validerat för häst. CV% för prover mellan 26-96 ng/ml var 0,2-14,8% och 0,1-6,2% för prover mellan 100-400 ng/ml. För prover under 20 ng/ml är kitet ej utvärderat då 20ng/ml är den lägsta standardkoncentrationen (Bohman, 2013).

Vid försöket att validera analysen även för hundplasma var variationskoefficienten 27-86% vilket inte ger ett tillförlitligt resultat. En kontroll av metodens utförande gjordes genom att beräkna CV% för standardkoncentrationerna i spädningsmedium. För standardkoncentrationerna 20-800 ng/ml var CV 2,2-8,1% vilket anses acceptabelt. Basala kortisolnivåer hos hund är 5-77 ng/ml till skillnad från människa vars kortisolkoncentrationer varierar mellan 30-230 ng/ml (Coolens, 1987; Boonen, 2014; Lathan *et al.*, 2014; Van Lanen & Sande, 2014; Sieber-Ruckstuhl *et al.*, 2015). De låga basalkoncentrationerna gör att hundarna hamnar i den nedre delen av eller under kvantifieringsspannet. Om kortisolet koncentrerats i samband med extraktionen skulle det möjligtvis gett ett mer tillförlitligt resultat då kortisolkoncentrationen hade varit högre vid analysen och därmed med säkerhet hamnat inom kvantifieringsspannet. Proverna från hund var även lipemiska vilket medförde att de inte kunde analyseras obearbetade då lipider kan orsaka analysfel bland annat genom att blockera antigenbindningar och absorbera ljus vid spektrofotometriska analysmetoder (Nicolac, 2014). En annan felkälla är det att steroiderna måste utvinnas ur plasman innan de kunde appliceras till Elisa-plattan. Förflyttningen av de lösta steroiderna skedde medelst dekantering för hand vilket möjliggör att en olika stor mängd kortisol behålls.

Läkemedel kan i sig ha effekt på HPA-axeln och kortisolkoncentrationerna i plasma (Nanda *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1998; Ingvast-Larsson *et al.*, 2010; Gonzales *et al.*, 2013). Ingen signifikant påverkan kunde påvisas i något av de tre beskrivna försöken. Under försöket med dexametason finns en tendens till minskning i medelkoncentrationen av plasmakortisol 2-6 timmar efter injektion till skillnad mot när hästarna enbart fått placebo. Dexametason hämmar den endogena kortisolinsöndringen genom negativ feedback på ACTH. Durationen av hämningen är en effekt av systemexponeringen för läkemedlet (Ekstrand *et al.*, 2015). Vid en dexametasonhämning som görs för att diagnostisera PPID rekommenderas att dexametason ges intramuskulärt i dosen 40 µg/kg och hämning av den endogena kortisolinsöndringen hos friska hästar kvarstår då vid provtagning efter 19-20 timmar (Dybdal *et al.*, 1994). I proverna tagna senare än sex timmar efter intrartikulär injektion av dexametason kunde inte längre en sådan trend ses förutom hos häst nummer 5 som också var den som fick den högsta dosen. Den troligaste förklaringen till utebliven kortisolsuppression är att de lägre doserna inte gav tillräckligt stor systemiskt exponering av dexametason under tillräckligt lång tid för att eventuella systemeffekter skulle kunna dokumenteras med rådande försöksdesign. En annan tänkbar bidragande orsak förutom dosvariationen är administrationsvägen. Den lokala

behandlingen i leden fordrar ett systemiskt upptag för att hämma hypothalamus och hypofys och det är rimligt att anta att biotillgängligheten inte var 100%. Det är på sin plats att påpeka att Dybdal et al (1994) utvärderade effekter efter intramuskulär administrering då det också är rimligt att anta en lägre biotillgänglighet än 100%. Slutledningsvis är det rimligen de i jämförelse lägre doserna i den aktuella studien som är den mest troliga förklaringen till den uteblivna kortisolhämningen. Ingen av hästarnas dygnsrytm rubbades med avseende på plasmakortisolnivåerna. Detta trots att flera av hästarna beskrivits som mycket stressade över de upprepade ledpunktionerna av deltagande forskare.⁴ Eftersom dygnsrytmen är beskriven som lätt föränderlig av stress (Bacus et al., 1990; Colborn et al., 1991; Stull et al., 2004; Mircean et al., 2007; Ayala et al., 2012) går det att spekulera i om den glesa provtagningen medförde att hästarna inte var stressade sett över dygnet och att kortvarig stress på grund av hantering vid några få tillfällen inte ger något utslag på den totala kortisolexponeringen.

Under försöket med penicillininjektioner kunde ingen signifikant skillnad ses mellan behandlingarna. Dygnsvariationerna av plasmakortisol under behandling med pc-lidokain är något mindre än under behandling med pc-prokain. En av hästarna, häst 5, har inte heller en uttalad dygnsrytm under pc-lidokain omgången. Häst 1 och 3 tycks även de ha mindre varierande kortisolnivåer innan timme 72 än efter. En förklaring skulle kunna vara att intramuskulära injektioner gavs två gånger dagligen under denna omgång. Trenden tycks vara att de totala kortisolnivåerna minskar efter timme 72 då en permanent kateter anlades. Extra tydligt är det på häst nummer 5 som efter det får ett mönster liknande normal dygnsrytm. Det skulle kunna tyda på att de upprepade injektionerna och venösa punktionerna ändå orsakade en aktivering av HPA-axeln. Viktigt att komma ihåg är dock att plasmakortisol endast analyserats med 12 timmars mellanrum fram till timme 72 och efter timme 84 vilket inte ger en rättvisande bild av dygnsvariationen.

Under dexametasonförsöket varierade kortisolkoncentrationerna i plasma mellan 5,0 ng/ml och 119,5 ng/ml och under penicillinförsöket varierade koncentrationerna mellan 2,0 ng/ml - 126 ng/ml. Basala kortisolkoncentrationer i plasma hos häst varierar enligt litteraturen mellan 15 ng/ml -140 ng/ml med högst koncentrationer under morgonen (Zolowick *et al.*, 1966; Toutain *et al.*, 1998; Hart *et al.*, 2012). Totalexponeringen av kortisol för hästarna under penicillinförsöket var betydligt högre än för hästarna under dexametasonförsöket. Skillnaden i totalexponering beror på att penicillinförsöket pågick under 120 timmar jämfört med dexametasonförsöket som pågick 76 timmar.

Alla individer hade plasmakoncentrationer av kortisol inom vad som anses vara normala referensintervall under försöken. Ingen statistiskt signifikant skillnad kunde heller ses mellan de olika behandlingsomgångarna. Djuren kan således ej bedömas som stressade under försöken baserat på plasmakortisolkoncentrationerna. Inte heller de injicerade läkemedlen har påverkat plasmakortisolkoncentrationerna med statistisk signifikans. Dexametason har en känd hämmande effekt på plasmakortisol men den intraartikulära administrationsvägen tycks ej ha påverkat kortisolkoncentrationerna annat än vid den högsta dosen 3 mg. De stora variationen mellan individer samt den naturliga dygnsvariationen av plasmakortisol gör dock att en aktivering av HPA-axeln ej kan uteslutas.

⁴ Personligt meddelande Carl Ekstrand

TACK

Slutligen vill jag tacka min handledare Carl Ekstrand för hans hjälp både under laborationerna och med den skriftliga presentationen.

REFERENSER

- Aghighi, S. A., Tipold, A., Piechotta, M., Lewczuk, P. & Kastner, S. B. R. (2012). Assessment of the effects of adjunctive gabapentin on postoperative pain after intervertebral disc surgery in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 39:636–646
- Al-Damluji, S. & Francis, D. (1993). Activation of central α 1-adrenoceptors in humans stimulates secretion of prolactin and TSH, as well as ACTH. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 264:208-214.
- Användningen av försöksdjur i Sverige under 2012 RAPPORT 2013-10-21 Dnr: 31-3698/13
- Atkinson, H.C. & Waddell, B.J. (1997). Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle. *Endocrinology*, 138(9), 3842-3848.
- Auperin, B. & Geslin, M. (2008). Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content *General and Comparative Endocrinology* 158:234–239
- Ayala, I., Martos, N.F., Silvan, G., Gutierrez-Panizo, C., Clavel, J.G. & Illera, J.C. (2012). Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in Veterinary Science*, 93:103-107.
- Baucus, K.L., Ralston, S.L., Nockels, C.F., McKinnon, A.O., Squires, E.L. (1990). Effects of transportation on early embryonic death in mares. *Journal of animal science*, 68(2):345-351
- Benson, J., Grubb, T., Neff-Davis, C., Olson, W., Thurmon, J., Lindner, D., Tranquilli, W. & Vanio, O. (2000). Perioperative Stress Response in the Dog: Effect of Pre-Emptive Administration of Medetomidine *Veterinary Surgery*, 29:85-91
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., van Hooff, J. A. R. A. M., de Vries, H. W. & Moll, J. A. (2000). Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs *Animal Welfare*, 9:49-62
- Bergeron, R., Scott, S. L., Émond, J. P., Mercier, F., Cook, N. J. & Schaefer, A. (2002). Physiology and behavior of dogs during air transport *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 66:211-216
- Blackwell, E-J., Bodnariua, A., Tysona, J., Bradshaw, J. W. S. & Casey, R. A. (2010). Rapid shaping of behaviour associated with high urinary cortisol in domestic dogs *Applied Animal Behaviour Science*, 124:113-120
- Bohák, Z., Szabó, F., Beckers, J-F., Melo de Sousa, N., Kutasi O., Nagy, K. & Szenci, O. (2013). Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse *Domestic Animal Endocrinology*, 45:38–42
- Boman, S. (2013). Plasma Cortisol Concentrations after Treatment with Methadone alone or together with Acepromazine or Detomidine in Horses. Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap/Veterinärprogrammet (Examensarbete 2013:19)
- Boonen, E., Meersseman, P., Vervenne, H., Meyfroidt, G., Guíza, F., Wouters, P. J., Veldhuis, J. D. & Van den Berghe, G. Reduced nocturnal ACTH-driven cortisol secretion during critical illness. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 306:883–892
- Borrell, J., Llorens, I. & Borrell, S. (1975). Adrenal, plasma and urinary corticosteroids during single or repeated administration of morphine in cats. *European Journal of Pharmacology*, 31:237-242.

- Bortolami, E., Murrell J. C., & Slingsby, L.S. (2013). Methadone in combination with acepromazine as premedication prior to neutering in the cat. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 40:181–193
- Bottoms, G.D., Roesel, O.F., Rausch, F.D. & Akins, E.L. (1972). Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares. *American Journal of Veterinary Research* 33, 785–790.
- Castillo, V. A., Cabrera, Blatter, M. F., Gómez, N. V., Sinatra, V., Gallelli, M.F. & Ghersevich, M. V. (2009). Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Research in Veterinary Science*, 86:223–229
- Colborn D., Thompson, D., Roth, T. Jr., Capehart, S. & White, K. (1991). Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *Journal of animal science*, 69(6):2556-2562
- Coolens, J., Van Baelen, H., & Heyns, W. (1987). Clinical use of unbound plasma cortisol as Calculated from total cortisol and Corticosteroid-binding globulin. *Journal of steroid Biochemistry*, 26:197-202
- Cordero, M., Brorsen, B. & McFarlane, D. (2012). Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and α -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses *Domestic Animal Endocrinology*, 43: 317–324
- Dybdal, N.O., Hargreaves, K.M., Madigan, J.E., Gribble, D.H., Kennedy, P.C. & Stabenfeldt, G.H. (1994). Diagnostic testing for pituitary pars intermedia dysfunction in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204:627–632.
- Ekstrand C., Ingvast-Larsson C., Olsen L., Hedeland M., Bondesson U., Gabrielsson J. (2015). A quantitative approach to analysing cortisol response in the horse. *Journal of veterinary Pharmacological Therapeutics* doi: 10.1111/jvp.12276.
- EU:s försöksdjursdirektiv 2010/63/EU URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:sv:PDF>
- Freestone JF, Wolfsheimer KJ, Kamerling SG, Church G, Hamra J, Bagwell C. (1991). Exercise induced hormonal and metabolic changes in Thoroughbred horses: effects of conditioning and acepromazine. *Equine Veterinary Journal*, 23(3):219-23.
- 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*, 65:125-133.
- Gleerup, K., Forkman, B., Lindegaard, C. & Andersen, P. (2015). An equine pain face *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 42:103–114
- González Gil, A., Silván, G.Martínez-Fernández, L., & Illera J. C. (2013). Effects of different fentanyl anaesthetic mixtures on cortico- adrenal function in rabbits. *Veterinary Record*, 172: 213
- González-Gil, A., Villa, A., Millán, P, Martínez-Fernández, L., & Illera, J. C. (2015) Effects of Dexmedetomidine and Ketamine–Dexmedetomidine with and without Buprenorphine on Corticoadrenal Function in Rabbits *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(3):299–303
- Goy-Thollota, I., Decosne-Junota, C., Bonnet, J-M. (2007). Influence of aging on adrenal responsiveness in a population of eleven healthy beagles. *Research in Veterinary Science*, 82:195–201

- Hanson, P. (2015). Effekt av oralt administrerat cetirizin på histamininducerade kvaddlar hos hund. Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionen för biomedicin och veterinärfolkhälsovetenskap/Veterinärprogrammet (Examensarbete 2015:71)
- Haritou, S. J. A., Zylstra, R., Ralli, C., Turner, S. & Tortoneseà, D. J. (2008). Seasonal Changes in Circadian Peripheral Plasma Concentrations of Melatonin, Serotonin, Dopamine and Cortisol in Aged Horses with Cushing's Disease under Natural Photoperiod *Journal of Neuroendocrinology* 20:988–996
- Harris, R. (2015). Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 308:250–265
- Hart, K.A. (2012). The use of cortisol for the objective assessment of stress in animals: Pros and cons. *The Veterinary Journal*, 192:137-139.
- Hart, K. A., Dirikolu, L., Ferguson, D. C., Norton, N. A. & Barton, M. H. (2012). Daily endogenous cortisol production and hydrocortisone pharmacokinetics in adult horses and neonatal foals *American Journal of Veterinary Research*, 73(3):408
- Hawkins, P. (2002). Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Laboratory Animals*, 36:378–395
- Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, Lane S, Middleton V, Roughan JV, Wells S, Westwood K; UK Joint Working Group on Refinement BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFAW. (2011). A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* .45(1):1-13
- Hennesey, M. B., Davis, H. N., Williams, M. T., Mellott C. & Douglas C. W. (1997). Plasma Cortisol Levels of Dogs at a County Animal Shelter *Physiology & Behavior*, 62(3): 485–490
- Hergovich, N., Singer, E., Agneter, E., Eichler, H. G., Graselli, U., Simhand, C., & Jilma, B.(2001) Comparison of the Effects of Ketamine and Memantine on Prolactin and Cortisol Release in Men: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial *Neuropsychopharmacology* 24:(5)
- Hjelm-Björkman AK, Kapatkin AS, Rita HJ. (2011). Reliability and validity of a visual analogue scale used by owners to measure chronic pain attributable to osteoarthritis in their dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 72(5):601-7.
- Holton, L., Reid, J., Scott, E. M., Pawson, P. & Nolan, A. (2001). Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs *Veterinary Record*, 148:525-531
- Horváth, Z., Igyártó, B. Z., Magyar, A. & Miklósi, A.(2007). Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge *Hormones and Behavior* 52:621–630
- 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.
- Ingvast-Larsson, C., Holgersson, A., Bondesson, U., Lagerstedt, A.S. & Olsson, K. (2010). Clinical pharmacology of methadone in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 37:48-56.
- Irvine, C.H.G. & Alexander, S.L. (1994). Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, 11(2):227-238.

- Jager, L. P., De Graaf, G. J., & Aura Widjaja-Greefkes, H.C. (1998). Effects of atipamezole, detomidine and medetomidine on release of steroid hormones by porcine adrenocortical cells in vitro *European Journal of Pharmacology* 346:71–76
- Kogan, L. R., Schoenfeld-tacher, R. & Simon, A. A. (2012). Behavioral effects of auditory stimulation on kennel dogs. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 7:5:268-275
- Kolevska, J., Brunclik, V. & Svoboda, M. (2003). Circadian Rhythm of Cortisol Secretion in Dogs of Different Daily Activities *Acta Vet. Brno*, 72: 599–605
- Lathan, P., Scott-Moncrieff, J. C. & Wills, R. W. (2014). Use of the Cortisol-to-ACTH Ratio for Diagnosis of Primary Hypoadrenocorticism in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28:1546–1550
- Lamont, L., Burton, S., Caines, D., Masaoud, E. & Troncy, E. (2012). Effects of 2 different medetomidine infusion rates on selected neurohormonal and metabolic parameters in dogs *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 76:143–148
- Langford, DJ., Bailey, AL., Chanda, ML., Clarke, SE., Drummond, TE. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*. 7:447–449.
- McFarlane, D. (2007). Advantages and limitations of the equine disease, pituitary pars intermedia dysfunction as a model of spontaneous dopaminergic neurodegenerative disease *Ageing Research reviews*, 6:1:54-63
- McGowan, T. W., Pinchbeck, G. P. & McGowan, C. M. (2013). Prevalence, risk factors and clinical signs predictive for equine pituitary pars intermedia dysfunction in aged horses *Equine Veterinary Journal* 45:74–79
- Mircean, M., Giurgiu, G., Mircean, V. & Zinveliu, E. (2007). Serum cortisol variation of sport horses in relation with the level of training and effort intensity. *Bulletin*, 64:488-492.
- Mongillo, P., Prana, E., Gabai, G., Bertotto, D. & Marinelli, L. (2014). Effect of age and sex on plasma cortisol and dehydroepiandrosterone concentrations in the dog (*Canis familiaris*) *Research in Veterinary Science*, 96: 33–38
- MyAssays Ltd. URL: www.myassays.com/four-parameter-logistic-fit.assay
- Möllenhoff, A., Nolte, I., & Kramer, S. (2005). Anti-nociceptive Efficacy of Carprofen, Levomethadone and Buprenorphine for Pain Relief in Cats following Major Orthopaedic Surgery *Journal of Veterinary Medicine*. 52:186–198
- Nanda, A.S., Dobson, H. & Ward, W.R. (1992). Opioid modulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 9:181-186.
- Nikolac, N. (2014). Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochemia Medica*, 24(1), 57–67. <http://doi.org/10.11613/BM.2014.008>
- Nordlander, S. (2015). Cetirizin till hund - farmakokinetik och biverkningar. Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap/ Veterinärprogrammet (Examensarbete 2015:66)
- Orth, D. N., Peterson, M. E., & Drucker, W. D. (1988). Plasma Immunoreactive Proopiomelanocortin Peptides and Cortisol in Normal Dogs and Dogs with Cushing's Syndrome: Diurnal Rhythm and Responses to Various stimuli. *Endocrinology*, 122: 1250–1262

Pechnick, R.N. (1993). Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology*, 32:353-382.

Psatha, E., Alibhai, H., Jimenez-Lozano, A., Armitage-Chan, E. & Brodbelt, D. C. (2011). Clinical efficacy and cardiorespiratory effects of alfaxalone, or diazepam/fentanyl for induction of anaesthesia in dogs that are a poor anaesthetic risk. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 38:24–36

Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D. (2007). *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses*. 10th ed. London: Saunders Elsevier. s.102,103

Raekallo, M., Taylor, P. M., & Bennet, R. C. (1997). Preliminary Investigations of Pain and Analgesia Assessment in Horses Administered Phenylbutazone or Placebo After Arthroscopic Surgery *Veterinary Surgery*, 26:150-155.

Rijnberk, A. & Kooistra, H.S. (2010). Adrenals. I: S. Galac., C.E. Reusch., H.S. Kooistra, & A. Rijnberk, (red), *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*. 2. ed, reviderad och utökad. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co., kap. 4 & 12

Reul, J.M.H.M., Rothuizen, J. & de Kloet, E.R. (1991). Age-related changes in the dog hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Neuroendocrine activity and corticosteroid receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1-3):63-99.

Romano, M., Portela, D., Breggi, G. & Otero, P. E. (2015) Stress-related biomarkers in dogs administered regional anaesthesia or fentanyl for analgesia during stifle surgery *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, DOI: 10.1111/vaa.12275

Rosado, B., Garcia-Belenguer, S., Leon, M., Chacon, G., Villegas, A. & Palacio J. (2010). Blood concentrations of serotonin, cortisol and dehydroepiandrosterone in aggressive dogs *Applied Animal Behaviour Science* 123:124–130

Saeb, M., Baghshani, H., Nazifi, S. & Saeb, S. (2010). Physiological response of dromedary camels to road transportation in relation to circulating levels of cortisol, thyroid hormones and some serum biochemical parameters *Tropical Animal Health Prod* 42:55–63

Sieber-Ruckstuhl, N.S., Burkhardt, W.A., Hofer-Inteeworn, N., Riond, B., Rast, I.T., Hofmann-Lehmann, R., Reusch, C.E. and Boretti, F.S. (2015), Cortisol Response in Healthy and Diseased Dogs after Stimulation with a Depot Formulation of Synthetic ACTH. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29:1541–1546.

Sotocinal, S., Sorge, R., Zaloum, A., Tuttle, A., Martin, L., Wieskopf, J., Mapplebeck, J., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J., King, O. & Mogil, J. (2012). The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions *Molecular pain*, 7:55

Stephen, J. M., Ledger, R.A (2006). A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Physiology & Behavior*, 87:911–916

Stull, C., Spier, S., Aldridge, B., Blanchard, M. & Stott, J. (2004). Immunological response to long-term transport stress in mature horses and effects of adaptogenic dietary supplementation as an immunomodulator *Equine Veterinary Journal* 36(7):583-589

Svenska djurskyddslagen (1988:534) URL: <http://rkrattsbaser.gov.se/sfst?bet=1988:534>

Teixeira, R. CR., Monteiro, E. R., Campagnol, D., Coelh, K., Bressan, T. F., & Monteiro, B. S. (2013). Effects of tramadol alone, in combination with meloxicam or dipyrone, on postoperative pain

and the analgesic requirement in dogs undergoing unilateral mastectomy with or without ovariectomy *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 40:641–649

Toutain, P.L., Oukessou, M., Autefage, A. & Alvinerie, M. (1988). Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 5:55-59.

Van Lanen K. & Sande A. (2014). Canine hypoadrenocorticism: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Top Companion Animal Medicine*. 29(4):88-95.

Voulgaris, D. A., & Hofmeister, E. H. (2009). Multivariate analysis of factors associated with postanesthetic times to standing in isoflurane-anesthetized horses: 381 cases. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 36:414–420

Zolowick, A., Upson, D., Elftheriou, B. (1966). Diurnal variation in plasma gluko-corticosteroids in the horse (*Equus caballus*) *Journal of endocrinology* 35:249-253.