

# Metabolsk respons på stress hos griser

5.årsoppgave i stadium IV - medisinstudiet ved  
Universitetet i Tromsø

Hilde Paulsrud & Vegard Olsen, Kull 97

Veileder: Tor Steensrud

Tromsø, August 2002

## Førord

Det hele startet i andre studieår da vi hadde vår andre praktiske utplassering, og vi begge havnet på Kirurgisk Forskningslaboratorium under stipendiat Odd Petter Elvenes' kyndige hånd. Han utformet allerede da tema og problemstilling for oppgaven, og vi utførte i løpet av perioden to pilot forsøk som viste at prosjektet var gjennomførbart. Underveis har vi begge fått anledning til å gå på "kurs i forsøksdyrlære", som også vil kunne komme til nytte senere.

Siden oppstarten har vi gjort små justeringer, men problemstillingen har hele tiden vært den samme. Odd Petter Elvenes avsluttet etter hvert sitt stipendiat, og ble erstattet av stipendiat Tor Steensrud som har vært vår veileder i den tiden vi har utført forsøkene og formulert oppgaven.

Foruten disse to har vi også fått god hjelp av de ansatte på Kirurgisk Forskningslaboratorium; Hege, Ellinor og Hanne, samt ansatte ved Dyreavdelingen. Klinisk kjemisk avdeling ved UNN har hjulpet oss med analysering av prøver. Da vi stod fast i de fysiologiske resonnementer fikk vi verdifulle bidrag av Terje Larsen ved fysiologisk seksjon, IBM.

Vi vil rette en stor takk til alle de som har hjulpet oss underveis slik at det ble mulig for oss å gjennomføre denne oppgaven.

Tromsø 28. august 2002

Vegard Olsen

Hilde Paulsrud

## **Innholdsfortegnelse:**

<b>1</b>	<b>Resymé</b>	<b>side 4</b>
<b>2</b>	<b>Innledning og bakgrunn</b>	<b>side 5</b>
2.1	Hypotese	side 6
2.2	Fysiologisk forklaringsmodell på stressrespons	side 6
2.3	Reaksjon på psykiske stressfaktorer	side 6
2.4	Reaksjon på mekaniske stressfaktorer	side 7
2.5	Reaksjon på kjemiske stressfaktorer	side 7
2.5.1	Fentanyl som kjemisk stressfaktor	side 7
2.5.2	Midazolam som kjemisk stressfaktor	side 7
2.5.3	Pentobarbital som kjemisk stressfaktor	side 8
2.5.4	Ketamin som kjemisk stressfaktor	side 8
<b>3</b>	<b>Material og metode</b>	<b>side 9</b>
<b>4</b>	<b>Statistikk og resultat</b>	<b>side 11</b>
4.1	Plasma glukose nivå	side 11
4.2	Plasma laktat nivå	side 11
4.3	Plasma nivå av frie fettsyrer	side 11
4.4	Plasma kortisol nivå	side 11
<b>5</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>side 12</b>
5.1	Kommentarer til påvirkning av glukoseverdiene	side 12
5.2	Kommentarer til påvirkning av laktatverdiene	side 12
5.3	Kommentarer til påvirkning av verdiene av frie fettsyrer	side 12
5.4	Kommentarer til påvirkning av kortisolverdien	side 13
5.5	Kommentarer til eventuelle feilkilder	side 14
5.5.1	Diurnal variasjon av kortisolsekresjon	side 14
5.5.2	Metabolsk pavirkning fra før	side 14
5.5.3	Initialt stressnivå	side 14
5.5.4	Systemiske sykdommer	side 14
5.5.5	Rutiner ved prøvetaking og analysering	side 14
<b>6</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>side 16</b>
<b>7</b>	<b>Tabeller</b>	<b>side 17</b>
7.1	Tabell 1	side 17
7.2	Tabell 2	side 17
<b>8</b>	<b>Kilder</b>	<b>side 18</b>

## 1 Resymé

*Bakgrunn* : Vi har i vår studie undersøkt om stressfaktorer i innledningen til et forsøk kan påvirke nivåene av laktat, glukose og frie fettsyrer i blodet hos gris. Grisen er et mye brukt forsøksdyr og forandringer i plasmanivåer av laktat, glukose og frie fettsyrer brukes ofte i tolkningen av forsøkene. Ut fra vel etablerte fysiologiske forklaringsmodeller forventet vi økte nivåer av samtlige metabolitter i plasma.

*Metode*: Vi inkluderte 14 griser som var planlagte bloddonorer. Tre dager før forsøksdagen la vi inn et sentralt venekateter tunnelert ut i nakken for på forsøksdagen å kunne ta blodprøver av en tam, ustresst gris. Grisene ble deretter utsatt for mekanisk stress i form av tracheostomi og inlegging av sentralt venekateter, psykisk stress i form av håndtering av mennesker og kjemisk stress i form av medikamentene: ketamin (20 mg/kg), atropin (2mg), pentobarbital (10mg/kg) og fentanyl (0,02mg/kg). Det ble tatt et nytt sett blodprøver etter dette.

*Resultater*: Vi fant signifikant økte nivåer av laktat ( $-0,82 \pm 0,91$ ,  $p < 0,005$ ) og kortisol ( $-97,5 \pm 79,33$ ,  $p < 0,001$ ) i plasma. Glukose viste tendens til fallende konsentrasjon, men ikke signifikant ( $0,76 \pm 2,81$ ,  $p = 0,328$ ). Konsentrasjonen av frie fettsyrer i plasma viste et signifikant fall ( $383,47 \pm 366,30$ ,  $p < 0,002$ ).

*Diskusjon*: Ved stress frisettes adrenalin og kortisol, som videre fører til økte nivåer av laktat, glukose og frie fettsyrer i blodet. Vi fant derimot at frie fettsyrer ble signifikant redusert. En mulig forklaringsmodell for dette, er redusert blodgjennomstrømming i fettvev under stress. Dette vil føre til forsinket frisetting av frie fettsyrer som er spaltet av lagrede triglyserider under stress, og derfor redusert nivå i perifert blod under stressreaksjonen.

## **2 Innledning og bakgrunn**

Hensikten med denne studien er å undersøke effekten av stress på tre metabolske blodparametere hos griser. De parameterne vi valgte å måle, var glukose, frie fettsyrer og laktat. Vi har i tillegg målt nivået av kortisol i blodet som indikator på stressrespons hos grisene(1).

Bakgrunnen for at vi ønsket å gjøre disse målingene, er at griser er et mye brukt forsøksdyr, og det tas ulike blodprøver i løpet av et forsøk som en senere baserer seg på når en trekker konklusjoner av forsøket. Målet med forsøkene er som oftest å overføre resultatet av det over til en human situasjon. Vi vil derfor undersøke om den initiale behandlingen og anesteseringen av grisen som skjer før selve forsøket egentlig starter, har noen påvirkning på grisens metabolisme – og dermed på resultatet av blodprøver som tas under et forsøk.

Griser brukes som forsøksdyr i modeller som er ment å etterligne en human modell, og de er funnet velegnet til dette formålet i en rekke studier. En av de store fordelene, er at det er store anatomiske likheter mellom griser og mennesker på organnivå (2,3), men det er også av stor betydning at det er funnet store fysiologiske likheter mellom griser og mennesker (4,5,6). Det betyr altså at griser reagerer på liknende måte som et menneske fysiologisk sett når de utsettes for ulike stimuli, f. eks. stress.

Stress kan defineres på ulike måter. Her bruker vi følgende definisjon; ”stress respons er det navnet som er gitt de hormonelle og metabolske endringer som følger av skade eller traume” (7). Med ”skade” menes vevsskade, ”traume” er et mer vidt begrep som både kan ha direkte fysiske og/eller psykiske aspekter ved seg.

Vi har i vår studie utsatt grisene for en rekke stressfaktorer på samme måte som det de utsettes for i forsøk ellers. Grisene er i utgangspunktet generelt skeptiske til nærkontakt med mennesker, noe vi har utsatt dem for i stor grad. De har i tillegg tilbrakt to døgn isolert fra andre griser som de er vant til å være sammen med. Dette utgjør altså et psykisk traume. Videre har vi behandlet dyrene med forskjellige anestesimidler, dvs. utsatt dem for kjemiske stressfaktorer. Dessuten har vi gjort kirurgiske inngrep på dem i form av trakeostomering og innlegging av sentralt venekateter. Dette kan betraktes som mekanisk stress. Vi har ikke lagt til noen stressfaktorer selv, det dreier seg hele tiden om det samme som de vil bli utsatt for i et ordinært forsøk.

## 2.1 Hypotese

Vår hypotese er at ved innledningen av forsøket påvirkes metabolismen signifikant som følge av stress. I innledningen av forsøket utsettes de for psykisk stress, anestesi og kirurgi i form av trakeostomi og innlegging av sentralt venekateter. Dette kan man ikke utelukke at påvirker metabolske parametere.

## 2.2 Fysiologisk forklaringsmodell på stressrespons

Den umiddelbare responsen på stress, er aktivering av CRH- (corticotropin releasing hormone) og adrenerge nevroner i hypothalamus (8). CRH frigjøring påvirker binyrebarken via ACTH (adrenocorticotropic hormone), og vil raskt føre til en stigning i plasma-kortisolnivået. De adrenerge nevronene påvirker binyremargen og fører dermed til en frisetting av katekolaminer til blodet. Sagt på en forenklet måte er det altså kortisol og katekolaminer som er utgangspunktet for den metabolske stressresponsen.

Både kortisol og katekolaminer øker nivået av glukose i blodet; katekolaminer ( i hovedsak adrenalin) ved å aktivere glykogenolysen, og kortisol ved å bidra med aminosyrer som substrat til glukoneogenesen. Begge disse prosessene skjer i lever, men katekolaminer påvirker i tillegg glykogenolysen i skjelettmuskulatur. Dette fører til frigjøring av laktat til blodet slik at det kan gå til leveren og bidra som substrat for glukoneogenesen. I tillegg vil både kortisol og katekolaminer fasilitere en lipolytisk respons i fettvev i kroppen, slik at fett lagret som triglycider spaltes til glycerol og frie fettsyrer som så slippes ut i sirkulasjonen.

Vi kan oppsummere med å si at vi ved en stressrespons rent fysiologisk sett forventer økte nivåer av frie fettsyrer, glukose og laktat i plasma.

## 2.3 Reaksjon på psykiske stressfaktorer

I sin gjennomgang av de ulike aspekter ved bruk av griser som modeller for mennesker i forskning , peker Tumbleson og Schmidt (9) bl. a . på hvordan stressresponsen påvirker metabolismen. Psykisk stress forårsaket av f. eks. fengsling/tvang, er rapportert å øke laktatnivået 10 ganger, og også glukosenivået stiger (10). Brenner et al (11) har dessuten vist at tilsvarende psykiske stress forårsaker økte kortisol- og ACTH-nivåer, samtidig som deres studie også bekrefter økningen i glukose- og laktatnivåer. Baetz og Mengeling (12) viste at stress førte til økt nivå av frie fettsyrer i plasma. Samme resultat fikk Fernandez et al (13)

da de viste at griser som ble utsatt for stress i møte med andre griser fikk økte nivåer av frie fettsyrer, glukose og laktat i plasma.

#### **2.4 Reaksjon på mekaniske stressfaktorer**

Når det gjelder kirurgiske inngrep, er dette dokumentert som stressfaktor av Mansour et al (14) som påviste signifikant forhøyede nivåer av ACTH og kortisol i plasma hos griser etter det de klassifiserte som "mindre kirurgiske inngrep". Grad av stress som utløses ved kirurgiske inngrep er imidlertid omdiskutert; Taylor (15) finner at kirurgi ikke har noen tilleggseffekt på stressresponsen hos hester som allerede har fått anestesi, i hans forsøk i form av halothangass.

#### **2.5 Reaksjon på kjemiske stressfaktorer**

De ovenfor beskrevne metabolske responser gjelder dyr som har vært utsatt for psykisk stress, som oftest i form av fengsling, og/eller mekanisk stress i form av kirurgiske inngrep. Vi vil dessuten karakterisere bruk av anestesimidler som stressutløsende faktorer for kroppen, og vi kan ikke se bort fra den effekten disse har på metabolismen. Taylor viser at anestesi alene, i dette tilfelle halothan, fører til en stressrespons i hester med økte plasmakonsentrasjoner av ACTH, kortisol, glukose og laktat (16). I våre forsøk har vi brukt ketamin, fentanyl, pentobarbital og midazolam. Det er derfor naturlig å gjennomgå disse og den effekt på metabolismen som tidligere er beskrevet av disse medikamentene.

##### **2.5.1 Fentanyl som kjemisk stressfaktor**

Fentanyl er et syntetisk opioid, og det er vist at opioider reduserer hormonsekresjon fra hypothalamus og hypofyse (7). Under fentanylanestesi er det også vist reduksjon i glukoseproduksjonen, noe Yoshida et al mener kan skyldes en kombinasjon av redusert katekolamin-, kortikosteron- og glukagonsekresjon (15).

##### **2.5.2 Midazolam som kjemisk stressfaktor**

Midazolam og andre benzodiazepiner har vist seg å ha en inhiberende effekt på kortisolproduksjon *in vitro*, og selv om Crozier et al (16) peker på at benzodiazepiner virker på hypothalamus-hypofysenivå i stedet for på selve binyren, mener Desborough (7) at man likevel ikke kan utelukke at benzodiazepiner har en inhiberende effekt direkte på steroidproduserende celler. Vi forventer derfor ingen stigning av kortisolnivået i plasma ved bruk av benzodiazepiner.

### **2.5.3 Pentobarbital som kjemisk stressfaktor**

Bruk av pentobarbital som anestetikum har gjentatte ganger vist seg å føre til reduksjon av både kortisol- (17,18) og adrenalinnivåer i blodet (19). Pentobarbital inhiberer altså den metabolske stressresponsen man vanligvis ser når man utsetter dyr for tvang. Taylor (20) konkluderte med at under barbituratanestesi skjer det ingen signifikant endring av glukose-, laktat-, ikke-esterifiserte frie fettsyrer-, kortisol-, insulin-, katekolamin- og ACTH-nivåer i blodet. Bailey og Flatt fant det samme når det gjelder konsentrasjonen av frie fettsyrer – altså at den ikke endres under pentobarbitalanestesi (21). Clark et al mener derimot å se en tendens til at nivået av frie fettsyrer faller under anestesi med pentobarbital (22). De kunne imidlertid ikke vise til signifikante resultater i sin studie.

### **2.5.4 Ketamin som kjemisk stressfaktor**

Ketamin har en stimulerende effekt på det sympatiske nervesystem, det har vist seg at under ketaminpåvirkning øker hjertefrekvens, blodtrykk og hjertets minuttvolum. Dette er også bevist ved at man under ketaminanestesi har kunnet måle økte plasmanivåer av adrenalin og noradrenalin (23, 24) . At ketamin fører til en stressrespons bekreftes også av Gerard et al (25), som fant at kortisolnivået økte fem ganger hos griser etter ketamininjeksjon.



### 3 Material og metode

Grisene som blir benyttet under forsøket er Norsk Gris med en vekt mellom 45 og 55 kg. De er avlet frem hos en lokal bonde, og transporteres i bur fra Finnsnes til Tromsø. De inkluderes i et ordinært veterinær kontrollprogram frem til de blir innlosjert i dyreavdelingen fire til seks dager før den siste eksperimentelle prosedyre. Karantene anvendes ikke. Grisene er individuelt merket og blir holdt i 12 m<sup>2</sup> store binger sammen med andre griser. De har fri tilgang på vann. To ganger per dag blir de foret med omtrent 1 kg hver Kombi Norm Sur® (Felleskjøpet, Norge), som inneholder 14,8 % proteiner, 6,7 % fett og 59,8 % karbohydrater. Omgivelsestemperaturen er 20°C ± 1°C og lyset har tolv timer syklus (0700, 1900). Den relative luftfuktigheten er 55% ± 5%.

To dager før den siste eksperimentelle prosedyren, legges det inn et sentralt venekateter for senere blodprøvetaking. Grisen premediseres med 1g ketamin (Ketalar®, Park-Davis, Scandinavia AB, Solna, Sverige) og 2 mg atropin (Atropin®, Hydro Pharma, Oslo, Norge) intramuskulært. Grisen blir ytterligere anestesert med isofluran (Forene®, Abbott Laboratories, North Chicago, USA) i kombinasjon med oksygen ved behov. Lokal anestesimiddel, lidocain (Xylocain®, Astra, Södertälje, Sverige) settes i huden over vena jugularis externa sinister og langs midtlinjen på nakken. Et *Chemo-Cath® 9,6 Single Lumen Silicone Rubber Tunneled Catheter* (HDC Corporation, San Jose, CA, USA) tunneleres subkutan fremover fra nakken på grisen, og plasseres i vena jugularis externa sinister ved å benytte en åpen Seldinger teknikk. 50 IU/ml heparin (Løvens Kemiske Fabrikk, 2750 Ballerup, Danmark) i kombinasjon med saltvann injiseres i kateteret slik at lumen utfylles. Begge insisjonene sutureres, og enden på kateteret sikres med en ekstra festesutur.

Grisen separeres fra de andre grisene i et rom hvor omgivelsene er tilsvarende som i det første rommet. Den observeres for eventuelle komplikasjoner etter inngrepet.

For å minimalisere stressresponsen når den initiale blodprøven skal tas, må grisen akseptere at kateterenden i nakken håndteres. For å oppnå dette, tilbringer den personen som skal ta blodprøven en del tid sammen med grisen to ganger per dag. Samtidig injiseres 50 IU/ml heparin med saltvann inn i kateterlumen. Alt dette koordineres med måltidene til grisen. I løpet av denne perioden blir grisen vant til nærkontakt med mennesker og håndtering av kateteret. Den virker allerede etter kort tid ikke stresset av prosedyren.

Kl. 0730 den dagen grisen skal legges i narkose tas de initiale blodprøvene fra kateteret. Prøvene legges på is.

Grisen blir anestisert med 1000 mg ketamin i kombinasjon med 2 mg atropin, veid, vasket og tatt med inn på operasjonssalen. Her blir den plassert på et operasjonbord, og en venflon plasseres i en ørevene. I denne venflonen innledes anestesi med en bolusdose med 10 mg/kg pentobarbital (Pentobarbital®, Nycomed Pharma, Oslo, Norge) og 0,010 mg/kg fentanyl (Leptanal®, Janssen-Cilag, Beerse, Belgium). Et nytt sentralt venekateter plasseres i vena jugularis externa dexter. I dette kateteret gis pentobarbital 4 mg/kg/t, fentanyl 0,02 mg/kg/t og midazolam (Dormicum®, Roche, Basel, Switzerland) 0,3 mg/kg/t ved hjelp av en infusjonspumpe (STC 521, Therumo, Japan). Grisen trakeostomeres og ventileres med Servo 900 (Elema-Schönander, Stockholm).

Grisen betraktes nå som fullstendig anestisert, og endelige blodprøver kan tas fra det høyre venekateteret. Blodprøvene tas, plasseres i plastikkør, og nedkjøles umiddelbart på is før de blir sentrifugert på 14.000 rpm. Plasmaet blir så separert og lagret ved -70°C for senere kvantitering av plasmametabolitter på Cobas Fara II. Disse analysene er utført på kirurgisk forskningslaboratorium, MH. Kortisol er analysert ved klinisk kjemisk avdeling, UNN.

## **4 Statistikk og resultat**

14 Griser ble inkludert i programmet. Statistisk differanse mellom initiale og endelige blodparametere ble belyst ved å benytte en to-utvalgs t-test. Signifikansnivået er her definert som  $p < 0,05$ . I følgende presentasjon av resultater, viser vi til tabell 1 og tabell 2.

### **4.1 Plasma glukose nivå**

Plasma glukose nivå ble i gjennomsnitt redusert med 0,77 mmol/l fra 6,03 mmol/l til 5,26 mmol/l ( $p = 0,328$ ). Det var ingen konsistent trend i resultatene. Åtte griser hadde redusert nivå, mens seks griser hadde et økt nivå.

### **4.2 Plasma laktat nivå**

Plasma laktat nivå steg i gjennomsnitt med 0,82 mmol/l fra 0,66 mmol/l til 1,48 mmol/l ( $p = 0,005$ ). Trendene i disse resultatene var mer konsistente. Bare en gris hadde en reduksjon, mens resten hadde en økning i nivået av plasma laktat nivå.

### **4.3 Plasma nivå av frie fettsyre**

Plasma nivå av frie fettsyrer ble i gjennomsnitt redusert med 383,48 mmol/l fra 614,23 mmol/l til 230,75 mmol/l ( $p = 0,002$ ). Reduksjonen av denne blodparameteren var konsistent. Bare en gris hadde økning, mens resten hadde en reduksjon av verdien. Grisen som hadde en økning av denne blodparameteren var ikke den samme som noen av de to som hadde en reduksjon av plasma laktat verdien.

### **4.4 Plasma kortisol nivå**

Plasma kortisol nivå ble i gjennomsnitt hevet 97,5 nmol/l fra 102,07 nmol/l til 199,57 nmol/l ( $p = 0,001$ ). Alle grisene hadde en økning av denne blodparameteren.

## **5 Diskusjon**

Med bakgrunn i det vi vet om den basale, fysiologiske stressresponsen, forventet vi i utgangspunktet økning i samtlige av de blodparameterene vi undersøkte etter at vi eksponerte grisene for psykisk og mekanisk stress. Det var imidlertid vanskelig å vite hva slags effekt de kjemiske stressfaktorene ville ha. Tidligere studier gjort på dette område gir heller ingen entydige svar.

### **5.1 Kommentarer til påvirkning av glukoseverdiene**

I utgangspunktet forventet vi økte verdier av glukosekonsentrasjonen i plasma. Det er tidligere vist av bl.a. Taylor (16), Bickhardt et al (10) og Brenner et al (11) en økning av plasmaglukosenivå som følge av stresspåvirkning. Vi fikk imidlertid ingen økning, men derimot en ikke-signifikant reduksjon av glukosekonsentrasjon på 0,76 mmol/l. Verdiene var varierende; noen steg, mens andre sank som følge av stresspåvirkningen. Dette mener vi i stor grad kan forklares ut fra feilkilder som kommenteres senere.

### **5.2 Kommentarer til påvirkning av laktatverdiene**

Ut fra tidligere forsøk der laktat er målt før og etter en stressreaksjon, forventet vi en stigning av denne parameteren. Dette viser bl.a. Bickhardt et al (10) og Fernandez et al (13). Vårt forsøk støtter opp om disse funnene da vi også påviste en signifikant økning av laktatkonsentrasjonen på 0,82 mmol/l som følge av eksponering for flere ulike stressfaktorer.

### **5.3 Kommentarer til påvirkning av verdiene av frie fettsyrer**

Tidligere studier på dette området viser varierende resultater. Studier som innebærer psykisk stress har vist seg å føre til en økning av konsentrasjon av frie fettsyrer (12, 13). Andre forsøk som tar for seg pentobarbitalanestesi som stressfaktor, har derimot vist både ingen endring (22, 23) og en tendens til reduksjon (24) av nivåene av frie fettsyrer i plasma. Taylor (15) sammenlignet i en studie konsentrasjon av frie fettsyrer mellom to grupper av hester/ponnier hvor den ene fikk thiopenton og guaiphenesin som anestesimiddel og den andre gruppen fikk tilsvarende anestesi, samt at det ble utført et kirurgisk inngrep på dem. Konklusjonen fra denne studien viste at kirurgien bidro i liten grad i tillegg til anestesi som stressfaktor. Han fant at konsentrasjonen av frie fettsyrer falt i begge grupper, og han begrunner dette med at anestesen demper den  $\beta$ -adrenerge sympatiske responsen, og dermed lipolysen. Vår studie viser et signifikant fall i konsentrasjon av frie fettsyrer på 383,47  $\mu$ mol/l som følge av stress. Her kan det være mange årsaksfaktorer som spiller inn. Bruk av

pentobarbital som anestesimiddel er allerede nevnt som en mulig årsak til at nivåene reduseres, slik det er beskrevet av Clark et al (24). Et annet mulig bidrag fra de kjemiske stressfaktorene, kan være bruk av fentanyl fordi opioider generelt reduserer katekolaminsekresjonen. Dermed skjer det ingen katekolaminindusert lipolyse og heller ingen frisetting av frie fettsyrer til blodet. Dette viser bl.a. Yoshida et al (17).

Det er trolig mer enn anestesimidlene som spiller inn her. Larsen et al (30) fant i sine forsøk der de lot en rotte løpe på tredemølle og slik utløste en stressrespons, at under forsøket hadde rottene et stabilt nivå av frie fettsyrer i blodet, mens nivået steg en stund etter at rotten hadde sluttet å løpe. Samtidig målte man glycerol og så at disse verdiene begynte å stige med en gang rotten begynte å løpe. En annen del av dette forsøket var å måle blodgjennomstrømmingen i fettvev under stress, og resultatet av det var at man påviste redusert blodgjennomstrømming i fettvev under en stressreaksjon. Da man tidlig i stressituasjonen kunne registrere økte glycerolnivåer i blodet, er dette et tegn på at det skjer en stressutløst spalting av triglycerider i fettvev. Det er imidlertid redusert flow i det samme vevet, noe som fører til redusert tilførsel av albumin som fettsyrer er helt avhengige av for å kunne transporteres ut i blodet. Frigjøringen av frie fettsyrer forsinkes dermed til stress opphører og blodgjennomstrømmingen i vevet bedres. Glycerol derimot er et vannløselig molekyl som fraktes ut i sirkulasjonen uavhengig av transportproteiner.

I tillegg vet vi at omsetningen av frie fettsyrer i blodet er svært rask med en halveringstid på omtrent to minutter (31), slik at når tilførselen av frie fettsyrer til den systemiske sirkulasjonen stanser opp, tar det ikke lang tid før nivået faller.

Alle de punktene som nevnes her kan godt forklare resultatet vårt, men det er en svakhet ved våre forsøk at vi ikke har målt glycerol for å bekrefte spalting av triglycerider eller blodgjennomstrømmingen i fettvev.

#### **5.4 Kommentarer til påvirkning av kortisolverdiene**

Konsentrasjonen av kortisol i plasma bekrefter en stressrespons (1). Etter å ha eksponert grisene for stressfaktorer, påviste vi en forventet signifikant stigning av plasmakortisolnivå på 97,50 nmol/l.

## **5.5 Kommentarer til eventuelle feilkilder**

### **5.5.1 Diurnal variasjon av kortisolsekresjon**

Det er vist at basal sekresjon av kortisol har en diurnal variasjon med høyest verdier om morgenen (28). Reaksjonen på en gitt stressfaktor vil dessuten gi kraftigst økning av kortisolverdiene om morgenen (29). Da blodprøvene i samtlige av våre forsøk er tatt omtrent kl. 0730 og 0830, unngår vi at diurnal variasjon fører til forskjeller i kortisolkonsentrasjonene mellom grisene.

### **5.5.2 Metabolsk påvirkning fra fôr**

Grisene skulle i følge protokollen være fastende 12 timer før forsøket. Dette har av ulike grunner enkelte ganger ikke blitt opprettholdt. Det er derfor grunn til å tro at spesielt glukoseverdiene, men også verdiene av frie fettsyrer kan være påvirket av dette.

### **5.5.3 Initialt stressnivå**

Vi har ingen objektive mål for om grisene er stresset når den initiale blodprøven taes. Subjektivt virker de rolige og viser ingen motstand til at vi handler venekateteret. Vi kan likevel ikke utelukke at de har et visst stressnivå allerede da. Forskjellene mellom verdiene av de initiale og endelige blodprøvene vil i så tilfelle være underestimert.

### **5.5.4 Systemiske sykdommer**

Vi kan ikke utelukke at grisene som er med i forsøket har systemiske sykdommer som f.eks. diabetes mellitus, som eventuelt kan påvirke verdiene av de målte metabolittene. Dette er ikke undersøkt nærmere.

### **5.5.5 Rutiner ved prøvetaking og analysering**

Noen av de analyserte verdiene (gris 1 glukose post og frie fettsyrer pre, gris 6 frie fettsyrer pre og gris 14 frie fettsyrer pre) er svært avvikende når man sammenligner dem med verdiene fra de andre grisene. Det kan skyldes feil for eksempel under prøvetaking og analysering. En kan diskutere om disse verdiene burde vært utelukket fra det endelige resultatet. Det ville likevel ikke hatt noen effekt på p-verdiene, da de fremdeles ville vært på samme side av det vi definerte som signifikansnivå. En kan imidlertid tenke seg at det kunne hatt innvirkning på standardavvikene, som ville blitt mindre. Vi valgte å ikke utelukke disse verdiene.

Det varierte noe hvor mye av den kontinuerlige dosen av anestesi grisene hadde fått før den endelige blodprøven ble tatt. Dette kan tenkes å innvirkning på verdiene, men det må nevnes at den kontinuerlige dosen er svært liten i forhold til bolusdosen som alle grisene fikk. Vi mener derfor at dette ikke har påvirket resultatene i stor grad.

## **6 Konklusjon**

Resultatene må sees i sammenheng med diskuterte feilkilder. Vi har målt endringer i nivåene av glukose, frie fettsyrer og laktat i plasma før og etter en stressreaksjon. I tillegg har vi målt kortisol som indikator på stress. Da kortisolnivåene i plasma økte signifikant, er det grunnlag for å hevde at vi med ulike faktorer har påført grisene en stressreaksjon. De beskrevne resultatene indikerer at griser som eksponeres for stress i form av psykisk, mekanisk og kjemisk stress får en metabolsk respons. Forsøket viste at nivåene av laktat i plasma stiger, dette som forventet ut fra fysiologiske forklaringsmodeller og tidligere utførte studier. Forsøket viste ingen signifikant endring i glukosenivå. Nivået av frie fettsyrer i plasma ble redusert. Dette resultatet kan forklares med at frie fettsyrer som spaltes fra triglycider i fettvev ved en stressrespons, ikke kommer umiddelbart til syne i plasma grunnet endringer i perfusjonsforholdene.

Av disse funnene ser vi at griser som utsettes for kjemiske, psykiske og mekaniske stressfaktorer får en metabolsk respons som en må ta hensyn til når en bruker griser som forsøksdyr.



## 7 Tabeller

### 7.1 Tabell 1

Gris nr.	Glukose			Laktat			Frie fettsyrer			Kortisol		
	Pre	Post	Diff	Pre	Post	Diff	Pre	Post	Diff	Pre	Post	Diff
1	5,98	0,55	5,43	0,48	0,55	-0,07	1001,03	106,97	894,07	198,00	276,00	-78,00
2	5,98	2,96	6,55	1,04	0,56	0,48	212,82	109,96	102,86	41,00	227,00	-186,00
3	5,97	5,29	0,68	0,71	0,90	-0,19	569,97	151,97	418,00	156,00	256,00	-100,00
4	4,62	4,48	0,14	0,71	3,21	-2,50	810,49	529,28	281,21	58,00	257,00	-199,00
5	5,92	5,31	0,61	0,59	0,96	-0,37	482,84	106,53	376,31	64,00	112,00	-48,00
6	8,74	4,45	4,29	0,91	1,53	-0,62	93,55	137,12	-43,57	95,00	124,00	-29,00
7	4,61	6,69	-2,08	0,40	2,64	-2,24	642,59	228,83	413,76	44,00	105,00	-61,00
8	5,64	7,78	-2,14	0,52	1,32	-0,80	560,52	271,52	289,01	194,00	292,00	-98,00
9	6,11	6,68	-0,57	0,50	1,76	-1,26	492,21	221,13	271,08	72,00	234,00	-162,00
10	5,81	7,16	-1,35	0,54	2,29	-1,75	565,47	170,96	394,51	148,00	186,00	-38,00
11	5,28	5,93	-0,65	0,50	0,58	-0,08	599,36	301,88	297,48	68,00	345,00	-277,00
12	6,22	4,76	1,46	0,25	0,02	0,23	293,74	101,43	192,31	59,00	62,00	-3,00
13	5,63	7,87	-2,24	1,28	2,62	-1,34	254,67	180,52	74,15	122,00	161,00	-39,00
14	4,31	3,77	0,54	0,81	1,71	-0,90	2019,95	612,48	1407,47	110,00	157,00	-47,00
Gj. snitt	6,03	5,26	0,76	0,66	1,48	-0,82	614,23	230,75	383,47	102,07	199,57	-97,50
SD	1,45	2,01	2,81	0,27	0,95	0,91	469,76	158,06	366,30	53,78	82,60	79,33

Tabell 1. Målt initielle og endelige verdier av glukose, laktat, frie fettsyrer og kortisol. Glukose og laktat er målt i mmol/l, frie fettsyrer er målt i  $\mu$ mol/l, og kortisol er målt i nmol/l.

### 7.2 Tabell 2

Metabolitt	Preanestesert konsentrasjon	Postanestesert konsentrasjon	95% konfidensintervall	p-verdi (to-utvalgs t-test)
Glukose	6,03	5,26	-0,9 , 2,4	0,328
Laktat	0,66	1,48	-1,3 , - 0,3	0,005
Frie fettsyrer	614,23	230,75	172 , 595	0,002
Kortisol	102,07	199,57	-143 , -52	0,001

Tabell 2. Gjennomsnittlig forandring av glukose-, laktat-, frie fettsyrer og kortisolnivå etter eksponering av stressfaktorer. Glukose og laktat er målt i mmol/l, frie fettsyrer i  $\mu$ mol/l, og kortisol i nmol/l.

## 8 Kilder

- 1 Becker BA, Nienaber JA, Christenson RK, Manak RC, DeShazer JA, Hahn G. Peripheral concentrations of cortisol as an indicator of stress in pig. *Am J Vet Res* 1985 May;46(5): 1034-8
- 2 Douglas WR. Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci* 1972; 3:226-34
- 3 Swindle, Horneffer, Gardner. Anatomic and anaesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine. *Lab Animal Sci* 1986 Aug; 36(4):357-61
- 4 Brechbuler T, Kaeslin M, Wyler F. Reference values of various blood constituents in young minipigs. *J Clin chem biochem* 1984; 22:301-4
- 5 Pond WG, Houpt KA. *The biology of the pig*. New York: Comstock publishers Ithaca, 1978;
- 6 Kyle OC, Novak S, Bolooki H. General anaesthesia in pigs. *Lab animal sci* 1979; 29(1):123-4
- 7 Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* 2000; 85:109-17
- 8 Berne og Lewy. *Physiology*
- 9 Tumbleson ME, Schmidt DA. *Swine clinical chemistry*. I: Tumbleson M E (editor) *Swine in biomedical research*. Plenum publishing corporation, 1986: 783-807
- 10 Bickhardt K, Wirtz A. Der Einfluss von anbindenstress und futterung auf Blutmesswerte des Schweines. *DTW* 1978;85: 457-8, 460-2
- 11 Brenner K-V, Gurtler H, Ziebarth S. Reaktion von Schweinen auf eine Fixation mittels Oberkieferschlinge anhand von klinisch-chemischen Parametern im Blut. *Monatsch Veterinaer med* 1979;34:28-31
- 12 Baetz AL, Mengeling WL. Blood constituents changes in fasted swine. *Am J Vet Res* 1971;32:1491-99
- 13 Fernandez X, Meunier-Salaun MC, Mormede P. Agonistic behaviour , plasma stress hormones and metabolites in response to dyadic encounters in domestic pigs: interrelationships and effect of dominance status. *Physiol Behav* 1994 Nov; 56(5):841-7

- 14 Mansour MA, Stiegmann GV, Yamamoto M, Berguer R. Neuroendocrine stress response after minimally invasive surgery in pigs. *Surg Endoscop* 1992 Nov-Dec; 6(6): 294-7
- 15 Taylor PM. Effects of surgery on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in horses and ponies. *Research in veterinary science* 1998; 64:133-40
- 16 Taylor PM. Equine stress responses to anaesthesia. *Br J Anaesth* 1989 Dec; 63(6):702-9
- 17 Yoshida S, Hashimoto M, yamasaki K, Kaibara A, Shirouzu Y, Kakegawa T, Shiouzu K. Effect of fentanyl citrate analgesia on glucose production following trauma in rats. *J Surg Res* 1996 Mar; 61(2): 537-42
- 18 Crozier TA, Beck D, Schlager M, Wultke W, Kettler D. Endocrinological changes following etomidate, midazolam or methohexital for minor surgery. *Anesthesiology* 1987; 66:628-35
- 19 Sanhoury AA, Jones RS, Dobson H. Plasma concentrations of cortisol, testosterone, glucose and bloodgases in male goats during anaesthesia with pentobarbitone sodium. *Br Vet J* 1990 Jan-Feb; 146(1):36-42
- 20 Sanhoury AA, Jones RS, Dobson H. Pentobarbitone inhibits the stress response to transport in male goats. *Br Vet J* 1991 Jan-Feb; 147(1):42-8
- 21 Chauloff F, Baudrie V, Laude D. Pentobarbital anaesthesia prevents the adrenalin-releasing effect of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *Eur J Pharmacol* 1990 May 3; 180(1):175-8
- 22 Taylor PM. The stress response to anaesthesia in ponies; barbiturate anaesthesia. *Equine Vet J* 1990 Sep; 22(5):307-12
- 23 Bailey CJ, Flatt PR. Insulin and glucagon during pentobarbitone anaesthesia. *Diabete Metab* 1980 Jun; 6(2):91-5
- 24 Clark PW, Jenkins AB, Kraegen EW. Pentobarbital reduces basal liver glucose output and its insulin suppression in rats. *Am J Physiol* 1990 Apr; 258(4 Pt 1) : E701-7
- 25 Appel E, Dudziak R, Palm D, Wruk A. Sympathoneuronal and sympathoadrenal activation during ketamine anaesthesia. *Eur J Clin Pharmacol* 1979; 16: 91-5
- 26 Adams HA. Endocrine reactions following S-(+)-ketamine. *Anaesthesist* 1997 Mar ; 46 suppl 1: S 30-7

- 27 Gerard H, Sensky PL, Broom DM, Perremans S, Geers R. Influences of type of anaesthesia on cortisol,  $\beta$ -endorphin and heart rate in pigs. *Vet Res* 1996; 27: 219-26
- 28 Klemmecke HG, Nienaber JA, Hahn GL. Plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol in pigs: effects of time of day on basal and stressor-altered concentrations. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989 jan; 190(1): 47-53
- 29 Ruis MA, TeBrake JH, Engel B, Ekkel ED, Buist WG, Blokhuis HJ, Koolhaas JM. The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effect of age, gender and stress. *Physiol Behav* 1997 sep; 62(3):623-30
- 30 Larsen T, Myhre K, Vik-Mo H, Mjøs O. Adipose tissue perfusion and fatty acid release in exercising rats. *Acta Physiol Scand* 1981; 113:111-16
- 31 Guyton, Hall: Textbook of medical physiology. Tenth edition. Kapittel 68, side 282.

