



# Statens Husdyrbrugsforsøg 1986

## Meddelelse

8. APRIL

NR. 614

### Måling af langtidsstress

*Leif Lau Jeppesen og Knud Erik Heller  
Institut for Populationsbiologi  
Københavns Universitet*

Muligheden for at undgå skadevirkninger forårsaget af langtidsstress forudsætter, at den langtidsstressede tilstand kan måles i tide, før skadevirkningerne sætter ind, og helst med en billig og let metode.

I denne og en række tidligere undersøgelser påvises, at koncentrationen af eosinophile leukocyter i blodet er et stabilt mål for eksperimentelt og socialt betinget langtidsstress. Adfærdsmål, som baseres på, at langtidsstress øger flugtmotivation og reducerer aggression og eksploration, kan også anvendes.

Koncentrationen af glucocorticoider i blodet er et hyppigt anvendt mål for stress, men det viser i denne undersøgelse kun ringe korrelation med den påførte eksperimentelle belastning. Værien af glucocorticoider som mål for langtidsstress ønskes belyst i kommende arbejder.

#### Indledning

Dyr, som vedvarende udsættes for skadelige eller potentielt skadelige påvirkninger, udvikler langtidsstress. Det er en tilstand, der adfærdsmæssigt karakteriseres af øget flugtmotivation, nedsat eksplorationstendens og nedsat aggression. Fysiologisk er tilstanden – som kortere varende stress – karakteriseret af forøget binyrebarkaktivitet. For dyrenes trivsel medfører ubehandlet langtidsstress store skadevirkninger, som f.eks. mavesår, forhøjet blodtryk, åreforkalkning, nedsat modstadskraft mod sygdom og infektion, dårlig yngelpleje, utilstrækkelig komfortadfærd, osv. (Archer, 1979; Heller, 1985).

Da den langtidsstressede tilstand er så potentielt skadelig for animalsk produktion, er det nødvendigt at have let opnåelige og billige mål for den, så den kan erkendes i tide. Koncentrationen af glucocorticoider (corticosteron, cortisol) i blodet er det mål, som refererer mest direkte til den fysiologiske definition af stress, men målet er ikke nødvendigvis af den grund det mest anvendelige. Glucocorticoid-måling er relativt dyr og vanskelig at udføre, og netop glucocorticoiderne kan frigives og nedbrydes så hurtigt (Ganong, 1985), at stabile niveauer til afsløring af lang tids gentaget eller vedvarende belastning næppe kan forventes at eksistere. Flere andre, adfærdsmæs-

sige og fysiologiske, mål er i en række undersøgelser (Heller & Jeppesen, 1985, 1986; Jeppesen & Heller, 1985, 1986) netop blevet påvist som gode indikatorer for eksperimentelt såvel som socialt betinget langtidsstress, og tilbage står så spørgsmålet om værdien af glucocorticoid-koncentrationen som mål for langtidsstress, og spørgsmålet om den mere detaljerede sammenhæng mellem forskellige former for belastning og tidsmæssige belastningsforløb på den ene side og glucocorticoider og andre belastningsmål på den anden side.

I den foreliggende rapport beskrives et af de forsøg, der er udført med mink på Trollesminde, for at afklare disse spørgsmål. Forsøgets uafhængige variabel er immobiliseringsbelastning og de afhængige variable er dels glucocorticoid-koncentrationen og dels koncentrationen af eosinophile leukocyter, som vides at afspejle påført langtidsbelastning (f.eks. Heller & Jeppesen, 1985).

### Metoder

Undersøgelsen blev gennemført med 56 hunmink og 56 hanmink, som fra fødsel til forsøgsstart blev opfostret og holdt under konventionelle danske farmbetingelser. Ved forsøgsstarten, den 1/11 1985, blev de indhuser enkeltvis i almindelige minkbure, og fordelt ligeligt på 4 kontrolgrupper og 4 forsøgsgrupper. Hver gruppe bestod således af 7 hunner og 7 hanner.

Forsøgsdyrene blev i en 8-dages periode fra 11/11 til 19/11 belastede ved daglige opspændinger (immobiliseringer) i minkfælder. Hvert dyr blev opspændt i en time. Dyrene i de tre første forsøgsgrupper blev opspændt én gang pr. dag, dyrene i den sidste forsøgsgruppe blev opspændt to gange pr. dag. Blodprøver blev udtaget fra dyrene mellem kl. 13.00 og 15.00, og immobiliseringstidspunkterne blev tilrettelagt således, at opspændingen af forsøgsgruppe 1 blev påbegyndt en time før blodprøvetagning, opspændingen af forsøgsgruppe 2 blev påbegyndt 5 timer før blodprøve, opspændingen af forsøgsgruppe 3 blev foretaget 22 timer før blodprøve, og opspændingen af forsøgsgruppe 4, som blev opspændt to gange dagligt, blev påbegyndt 22 henholdsvis 5 timer før

blodprøve. Kontrolldyrene blev ikke opspændt.

Blodprøver blev udtaget efter én dags behandling og 8 dages behandling, og analyseret for corticosteron og cortisol (med proteinudskiftnings-, isotopfortyndingsmetodik på SH's afd. for dyrefysiologi og biokemi) og eosinophile leukocyter (efter metode i Zarrow et al.).

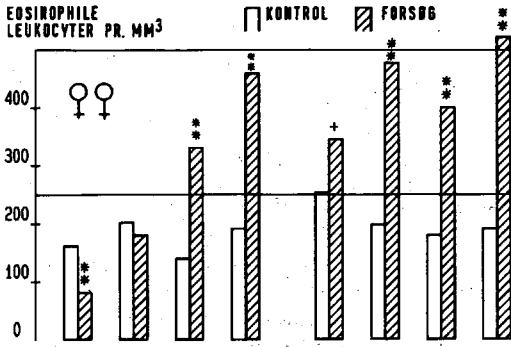
Resultater såvel som forsøgsdesign fremgår af figurerne.

### Resultater og diskussion

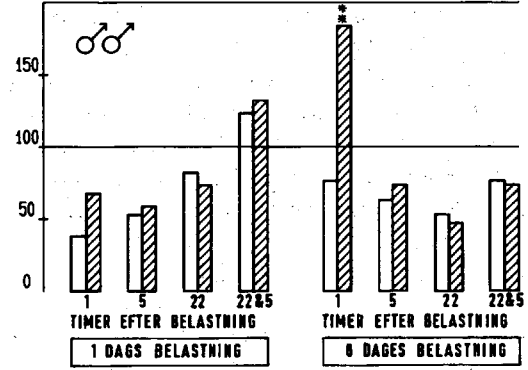
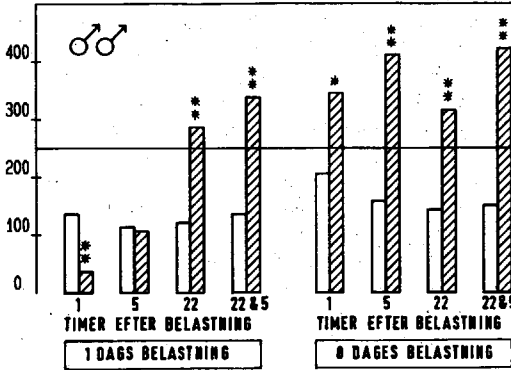
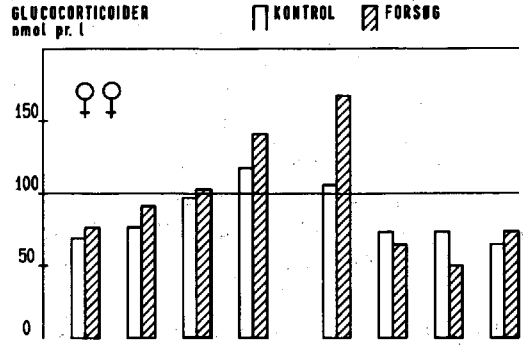
Koncentrationen af eosinophile leukocyter afslører pålideligt den her påførte gentagne belastning, idet den er forøget til alle tider efter de 8 dages belastninger. Dette er i overensstemmelse med tidligere forsøg (Heller & Jeppesen, 1985), som desuden viser, at koncentrationen af eosinophile leukocyter er forøget indtil 3 døgn efter afsluttet gentagen belastning. Glucocorticoid-koncentrationen viser ikke samme stabile respons på de gentagne belastninger. Den er – som forventet iflg. den korte halveringstid – kun forøget umiddelbart efter belastning (samlet beregning for hanner og hunner:  $P < 0.01$ , Mann-Whitney U-test, two-tailed).

Glucocorticoid-koncentrationen er i dette forsøg upåvirket af en enkelt gang belastning (samlet besregning for hanner og hunner:  $P = 0.43$ , Mann Whitney U-test, two-tailed.) Det er overraskende, at der end ikke en time efter første belastning vises tydeligt forøget glucocorticoid-koncentration. Tilsvarende forsøg (upublicerede) med 2–4 år gamle tæver viser størst glucocorticoid-reaktion en time efter én gangs belastning og en mindre, men dog signifikant, forøgelse efter 8 ganges belastning, og det er hvad der iflg. litteraturen kan forventes (Ganong, 1985; Hennessy et al., 1977). Den manglende 1. gangsreaktion i dette eksperiment kunne være forårsaget af, at de anvendte dyr – konventionelt holdte hvalpe – igennem hele deres opvækst ikke har været udsat for voldsomme engangsbelastninger, og derfor ikke har sensitiseret en reaktion på en sådan påvirkning. Dette spørgsmål søges belyst i kommende forsøg.

EOSINOPHILE  
LEUKOCYTER PR. MM<sup>3</sup>



GLUCOCORTICOIDER  
nmol pr. l



+ P=0,05 , \* P=0,01 , \*\* P=0,001 ; Mann Whitney U-test ; two-tailed.

Den jævne forøgelse af glucocorticoid-koncentrationen i kontrol og forsøgsdyr i tiden efter forsøgsstarten ( $P < 0.05$ . Kruskal-Wallis one-way analysis, two-tailed) kunne være forårsaget af selve forsøgsstarten, idet uro og skrigeri, der er stressorer, som dyrene har erfaring med, forøges ret markant, når belastningen af de forskellige grupper gennemføres. Også dette forhold tænkes undersøgt i kommende arbejder.

Hos de engangsbelastede dyr findes lavere niveauer af eosinophiler umiddelbart efter belastning og højere niveauer 22 timer efter belastning. Dette resultat afhænger af en belastningsinduceret frigivelse af eosinophiler fra blodet umiddelbart efter belastning, og en efterfølgende mobilisering af eosinophiler fra benmarv til blod (Heller

& Jeppesen, 1985). Om en tilsvarende dynamik er afgørende for koncentrationen af eosinophile leukocyter efter gentagne belastninger vides ikke, men data antyder en form for dynamik, idet grupperne med 5 timers interval mellem belastning og blodprøve har signifikant ( $P < 0.01$ . Mann-Whitney U-test, two-tailed) større koncentration af eosinophiler end gruppen med én times interval og gruppen med 22 timers interval. De lavere niveauer hos 1-timers-gruppen kunne afspejle øget frigivelse og moderat, stigende mobilisering. De højere niveauer hos 5-timers-grupperne kunne afspejle afsluttet frigivelse og maksimal mobilisering. De lavere niveauer hos 22-timers-gruppen kunne afspejle ophørt frigivelse og moderat, aftagende mobilisering. Forholdet vil

blive yderligere belyst ved undersøgelser, som i finere detaljer følger den tidsmæssige udvikling af eosinophil-svaret på belastning.

Kontrolniveauerne af eosinophiler og glucocorticoider er i dette forsøg større hos hunner end hos hanner. (Eosinophiler:  $P < 0.05$ . Glucocorticoider:  $P < 0.01$ . Mann-Whitney U-test, two-tailed.) Tidligere undersøgelser med eosinophiler (Jeppesen & Heller, 1985) udviser ikke en sådan kønsforskel for hvalpe, som gennem lang tid har været holdt i isolation. Den her observerede forskel kunne derfor som én mulighed være betinget af dette forsøgs korte isolationsperiode. En begyndende kønsmodning kunne også spille ind, idet der hos voksne dyr findes udtalt kønsforskel i niveauet af eosinophile leukocyter (Jeppesen & Heller, 1986). Dette forhold gør, at anvendelsen af eosinophile leukocyter, som mål for stress, må være betinget af et grundigt kendskab til den sæson- og kønsmæssige variation. Med denne betingelse opfyldt peger dette såvel som tidligere arbejder på, at koncentrationen af eosinophile leukocyter er velegnet, som mål for langtidsstress.

## Litteratur

- Archer, J. (1979). »Animals under stress«. Edward Arnold, London.
- Ganong, W. F. (1975). »Review of medical physiology«. Blackwell scientific publications, Oxford & Edinburgh.
- Heller, K. E. (1985). »Adfærdsmæssige stressreaktioner«. Disputats. Københavns Universitet.
- Heller, K. E. & Jeppesen, L. L. (1985). Behavioural and eosinophil leukocyte responses to single and repeated immobility stress in mink. *Scientifur*, 9, 174-178.
- Heller, K. E. & Jeppesen, L. L. (1986). Social stress effects on circulating eosinophil leukocyte levels in juvenile ranch mink. *Scientifur*, 10, in press.
- Hennessy, J. W., Levin, R. & Levine, S. (1977). Influence of experiential factors and gonadal hormones on pituitaryadrenal response of the mouse to novelty and electric shock. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 91, 770-777.
- Jeppesen, L. L. & Heller, K. E. (1985). Effects of housing conditions on circulating eosinophil leukocyte levels in male and female minks from four different farms. *Scientifur*, 9, 14-15.
- Jeppesen, L. L. & Heller, K. E. (1986). Stress effects on circulating eosinophil leukocytes, breeding performance, and reproductive success of ranch mink. *Scientifur*, 10, in press.