

FIZJOLOGIA ZWIERZĄT

ANDRZEJ KOWALSKI, REMIGIUSZ FITKO, HENRYK ZIELIŃSKI, EWA ROSZKO

Próby bezstresowego pobierania krwi u prosiąt

Zakład Patofizjologii Wydziału Weterynaryjnego ART, 10-957 Olsztyn

Pobieranie próbek krwi u zwierząt jest zabiegiem dość kłopotliwym i — zależnie od gatunku zwierzęcia, jego wieku i metody — trwającym od kilkudziesięciu sekund do kilku minut. Zabiegi te łączą się zawsze z chwytaniem zwierzęcia, jego unieruchomianiem i nakłuciem żyły. Manipulacje te wywołują u zwierząt stany napięcia emocjonalnego (bojaźń, strach), wysiłek fizyczny i odruchy ucieczki, wycofania się lub uniknięcia zabiegu. Wszystkie te sytuacje wywołują w ciągu kilkudziesięciu sekund stany stresowe, które — jeżeli pobieranie krwi trwa dłużej — przyczyniają się do zmian składu i właściwości fizykochemicznych surowicy (3). Tradycyjny sposób pobierania krwi od zwierząt może zmienić poziom takich składników jak: glukoza, cholesterol, białko, elektrolity, aktywność niektórych enzymów np. CPK, AP, AlAT, AspAT, jak również wskaźnik hematokrytu, liczbę erytrocytów i leukocytów, szybkość opadu krwi itp. Szczególnie nasilone zmiany powstają w tych sytuacjach w poziomie hormonów biorących udział w mechanizmach wyzwalania stresu np. katecholaminach, kortykoidach, hormonach tarczycy, serotoninie, opiatkach mózgowych, ACTH, TSH oraz gonadotropinach, prolaktynie itp. Z tego względu dla uniknięcia tych zmian i uzyskania prawidłowych wyników w wielu badaniach niezbędne jest pobieranie krwi w warunkach najbardziej zbliżonych do bezstresowych.

Pobieranie krwi w warunkach względnie bezstresowych możliwe jest przy pomocy kaniulowania żył. Opracowałem szereg metod kaniulowania żył u zwierząt doświadczalnych i gospodarskich do ciągłego lub częstego pobierania krwi. Warunkiem niezbędnym do działania kaniuli jest odpowiednie jej zabezpieczenie przed wypadaniem (bandażowanie, wszycie pod skórę, izolowanie zwierząt), częste pobieranie krwi i zabezpieczenie heparynowe. Kaniulowanie zwierząt w warunkach chowu grupowego w kojach napotyka na poważne trudności. Zwierzęta zgrupowane w kojach, czując krew u kaniulowanych zwierząt i zapach rany, niszczą kaniulę, wyrwywają ją z rany, a nawet kanibalizują osobnika. Wejście do koi grupowego dla dokonania pobrania krwi, podobnie jak i przy rutynowej metodzie pobierania, łączy się zawsze z zabiegiem chwytania i unieruchomienia zwierzęcia, co wywołuje stres i odpowiednie zmiany we krwi. Z tego

powodu metoda kaniulowania zwierząt w chowie grupowym nie jest przydatna gdy chodzi o uzyskanie krwi w warunkach bezstresowych.

Celem niniejszych badań było ustalenie w doświadczeniu na prosiętach, czy i w jakim stopniu pobieranie krwi metodą nakłucia żyły czczej przedniej jest zabiegiem stresowym. Jako kryterium stresu posłużono się poziomem hormonów katecholowych i kortyzolu we krwi. Badania te służyć miały do udoskonalenia metod pobierania krwi w dalszych etapach pracy nad poziomem tych hormonów u prosiąt w warunkach stresu technologicznego.

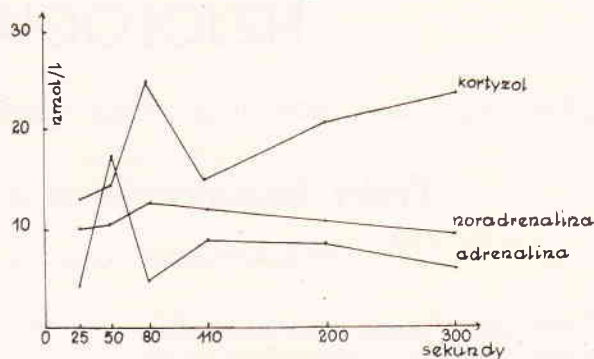
Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 6 prosiętach w wieku 28 dni w fermie tuczu przemysłowego w Knopinie. Prosięta wytypowano z 6 miotów przebywających z maciorą w kojach porodowych. Wybrano prosięta obu płci będące w dobrej kondycji i żywotności. Przed doświadczeniem zwierzęta wypoczywały po nakarmieniu i nie wykazywały najmniejszych objawów niepokoju i nietypowych zachowań. Do pobierania krwi zwierzęta chwymano nagle, z zachowaniem ciszy i spokoju. Od momentu uchwycenia zwierzęcia (czas „zero”) odmierzano czas kolejno wykonywanych czynności zakończonych pobraniem krwi. Założono pobieranie krwi w terminach: 25 sek., 60 sek., 95 sek., 120 sek., 180 sek. i 300 sek. przez wprowadzenie igły o wymiarach 1,4×40 mm do żyły czczej przedniej. Igły nie wyjmowano z żyły aż do zakończenia wszystkich pobrań. Jej światło zatykano w przerwach między pobraniami. Przeciętny czas od momentu uchwycenia zwierzęcia do wprowadzenia igły do naczynia i wypływu strumienia krwi wynosił 8—12 sek., do zakończenia pierwszego pobrania 20—25 sek., drugiego 50—55 sek., trzeciego 80—85 sek., czwartego 110—115 sek., piątego 200—210 sek. i szóstego 300 sek. Pobraną krew, po wstępnym przygotowaniu w fermie (odbiałczanie, odwirowanie w temp. +2°) przewożono w stanie zamrożenia do laboratorium Zakładu do analizy.

We krwi pobranej od zwierząt oznaczano poziom amin katecholowych (adrenaliny i noradrenaliny) metodą spektrofluorymetryczną wg Campuzano i wsp. (1) oraz poziom kortyzolu metodą radiokompetycyjną (8). Analiza zawartości katecholamin polegała na odbiałczaniu surowicy krwi, absorpcji amin na tlenku glinu, elucji kwasem nadchlorowym, a następnie utlenianiu związków do pochodnych trójhydroksyindolowych. Fluorescencję tych związków mierzono spektrofluorymetrem „Baird-Nova” prod. f-my Baird-Atomic (Anglia). Czulość metody do 0,1 ng substancji. Kortyzol oznaczano techniką izotopową z zastosowaniem standardowej metody radiokompetycyjnej. Znakowany trytem kortyzol uzyskano z firmy Amersham (Anglia). Czulość metody: 0,1 ng/ml. Odczynniki użyte do analiz posiadały wysoki stopień czystości chemicznej. Rozpuszczalniki i wodę odpowiednio redestylowano w szkle (wodę czterokrotnie). Liczbowe wyniki badań poddano analizie statystycznej obliczając odchylenie standardowe.

Tab. 1. Zawartość hormonów stresowych w surowicy krwi prosiąt poddanych zabiegowi pobierania krwi

Termin pobrania krwi w sekundach	Adrenalina nmol/l	Noradrenalina nmol/l	Kortyzol nmol/l
25	4,11 ± 2,0	9,56 ± 3,6	13,17 ± 5,7
50—55	17,15 ± 5,5	9,75 ± 1,3	14,76 ± 5,4
80—85	4,31 ± 1,6	12,58 ± 8,2	24,76 ± 10,7
110—115	8,92 ± 3,2	11,64 ± 5,8	15,03 ± 7,3
200—210	8,34 ± 2,9	10,85 ± 3,0	20,33 ± 9,5
300—320	6,17 ± 5,0	9,10 ± 2,6	25,75 ± 11,8



Ryc. 1. Dynamika uwalniania adrenaliny, noradrenaliny i kortyzolu podczas zabiegu pobierania krwi metodą tradycyjną

Wyniki i omówienie

Poziomy hormonów stresowych w surowicy krwi prosiąt poddanych zabiegom pobierania krwi w badanych odstępach czasu podaje tab. 1, natomiast dynamikę ich zmienności przedstawiono na ryc. 1.

Z danych tabeli wynika, że najszybciej, bo już po 20—25 sek. od zadziałania stresora (uchwycenie zwierzęcia) występuje szybkie podwyższenie poziomu adrenaliny we krwi obwodowej (z poziomu 4,11 do 17,15 nmol/l po 50 sek.), a następnie równie gwałtowne obniżenie do poziomu wyjściowego i ponowny wzrost do wartości 8,92 nmol/l po około 110—115 sek. z tendencją do nieznacznego i powolnego spadku do końcowego czasu 5 min.

Przebieg krzywej zawartości noradrenaliny wskazuje, że wzrost zawartości tego hormonu we krwi następuje po około 50 sek. Z poziomu 9,75 nmol/l osiąga on wartość 12,56 nmol/l po 80—85 sek., po czym następuje powolny spadek do wartości wyjściowych przed upływem badanego okresu.

Krzywa poziomu kortyzolu wykazuje początkowo przybliżony kształt do krzywej adrenaliny, jednakże wyraźny wzrost zawartości tego hormonu we krwi zaczyna się po około 50 sek. (14,76 nmol/l) i osiąga szczyt po 80—85 sek. (24,76 nmol/l). Po około 110 sek. doświadczenia następuje obniżenie poziomu kortyzolu do wartości wyjściowej, a następnie znaczny i stały jego wzrost do końca okresu badań.

Godny uwagi jest odmienny przebieg krzywej poziomu adrenaliny i kortyzolu w początkowych okresach badań uwidaczniający opóźnione wydzielanie kortyzolu w stosunku do adrenaliny.

Przeprowadzone badania wskazują, że „bezs stresowe” pobieranie krwi od prosiąt w miocie możliwe jest tylko w ciągu pierwszych 20—25 sek. trwania zabiegu. Stosowana procedura nie powoduje w tym czasie u prosiąt podwyższenia poziomu katecholamin i kortykoidów.

Krzywa poziomu hormonów w czasie 5 min. stresu manipulacyjnego wskazuje dość wyraźnie na dwuetapowość przebiegu reakcji. W

pierwszej fazie, już po 25 sek., nasila się gwałtownie stężenie adrenaliny we krwi obwodowej. W drugim etapie, dopiero po 80—85 sek. stwierdza się podwyższenie poziomu noradrenaliny i kortyzolu. Badania nasze potwierdzają w pewnej mierze wcześniejsze stwierdzenia niektórych autorów (2, 4) o dwuetapowym przebiegu stresu. Zjawiska te zależne są prawdopodobnie od kolejnego uruchomienia w stresie dwóch mechanizmów adaptacyjno-obronnych: jako pierwszego — układu współczulno-rdzeniowonadnerczowego z wyrzutem adrenaliny i w dalszej kolejności — układu podwzgórzowo-przysadkowo-korowonadnerczowego z wyrzutem głównie kortyzolu.

Zmienność poziomu hormonów w dalszych minutach trwania stresu jest również interesująca. Wzrastający poziom kortyzolu i obniżenie się zawartości katecholamin wskazuje na przechodzenie zwierząt w drugi etap stresu tj. w stadium przystosowania — wg klasycznej teorii stresu Selyego (5). Zjawisko to godne jest zatem dalszych, poszerzonych badań w różnych warunkach stresu u zwierząt gospodarskich.

Wnioski

Przeprowadzone badania upoważniają do postawienia następujących wniosków:

1. Odpowiedź hormonalna prosiąt w postaci podwyższonego poziomu katecholamin i kortyzolu we krwi pojawia się dopiero po 20—22 sek. wykonywania zabiegu pobierania krwi rutynową metodą nakłucia żyły. W tym czasie możliwe jest bezstresowe pobieranie krwi.

2. Wyrzut hormonów stresowych do krwi ma u prosiąt w okresie 5 min. pobierania prób przebieg dwufazowy.

Pismienictwo

1. Campuzano H. C., Wilkerson J. E., Horvath S. M.: Ann. Bioch. 64, 578, 1975.
2. Dantzer R., Mormede P.: J. Anim. Sci. 57, 6, 1983.
3. Fitko R.: Weterynaria, ART Olsztyn, 11, 69, 1979.
4. Levi L.: Emotional stress. L. Levi, Basel, 1967, s. 152.
5. Selye H.: Stress. Acta Inc., Montreal, 1950.

6. Stupnicki R., Kokot F.: Metody radioimmunologiczne i radiokompetycyjne stosowane w klinice. PZWL, Warszawa 1979.

Adres autora: dr Andrzej Kowalski, ul. Wyzwolenia 9 m. 8, 10-105 Olsztyn

Ковальский А., Фитко Р., Зелинский Г., Рошко Э. — Попытки бесстрессового взимания крови у поросят

Провели оценку рутинного метода взимания крови из передней полой вены у поросят и влияния этого мероприятия на динамику освобождения стрессовых гормонов (адреналина, норадреналина, кортизола) в кровь. Кровь брали по истечении 25 сек., 50 сек., 85 сек., 115 сек., 200 сек. и 300 сек., считая время от момента поймки животного.

Исследования показали, что гормональная реакция на взятие крови протекала в 2 фазах. Отмечали отчетливое быстрое повышение уровня определяемых гормонов во время 55—85 сек., затем понижение через 85—115 сек. до исходных величин и повторный (за искл. норадреналина) рост содержания в крови. Установили, что взятие крови из передней полой вены у 28-дневных поросят в те-

чение 20—25 сек. от входа персонала в клетку и поймки животного до окончания сбора крови не вызывает изменений в уровнях исследуемых гормонов.

Kowalski A., Fitko R., Zieliński H., Roszko E. — Trials of a stressless method of blood collection in piglets

The authors evaluated a routine method of blood collection from the vena cava cranialis in piglets and effects of blood collection on dynamics of a release of stress hormones (adrenalin, noradrenalin, cortisol) into blood. Blood was collected after 25, 50, 85, 115, 200 and 300 sec. after catching of piglets. It was found two stage hormonal reaction on blood collection. It was found a significantly faster increase of the level of these hormones after 55—85 sec. then their decrease after 85—115 sec. to the basal values and then (except noradrenalin) their increase in blood. Blood collection from the vena cava cranialis in 28 days old piglets in 20—25 sec. since the entrance of the persons into the box and catching of piglets not affect the level of the examined hormones.

STANISŁAW BARANOW-BARANOWSKI, KRZYSZTOF JANUS, DOROTA JAKUBOWSKA

Kształtowanie się zawartości sodu, potasu i chlorków w płynie pozakomórkowym organizmu cieląt w pierwszym miesiącu ich życia

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR,
ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin

Zmiany zawartości jonów sodu, potasu i chloru w osoczu krwi cieląt wraz z wiekiem były już przedmiotem badań wielu autorów (1, 2, 3, 8, 9). Uzyskane wyniki wskazują na względną stabilność poziomu Na i Cl w osoczu w trakcie postnatalnego rozwoju cieląt (2, 3, 10), oraz na stopniowe obniżanie się koncentracji jonów potasu (1, 3, 10).

W dostępnym piśmiennictwie nie natrafiono natomiast na publikacje omawiające w sposób kompleksowy zmiany zawartości Na, K i Cl w osoczu, razem ze zmianami objętości płynu pozakomórkowego i osocza. Celem przeprowadzonych badań było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy zawartość jonów sodu, potasu i chloru w płynie pozakomórkowym organizmu cieląt ulega w pierwszym miesiącu ich życia zmianom i czy zmiany te są statystycznie istotne.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 12 cielętach-byczkach rasy cb w wieku 5—31 dni. W czasie trwania doświadczenia zwierzęta utrzymywano w kojach pojedynczych i żywiono zgodnie z ogólnie przyjętymi normami.

Ogółem dokonano 144 oznaczeń poziomu sodu, potasu i chlorków w osoczu oraz objętości płynu pozakomórkowego (ECF) i osocza (PV). Stężenie Na i K oznaczano metodą fotometrii płomieniowej, a Cl metodą potencjometrycznego miareczkowania azotanem srebra. Zawartość płynu pozakomórkowego określano

metodą rodankową (4), a osocza przy zastosowaniu błękitu Evansa T-1824 (12). Stosowano następujące dawki substancji testowych:

- 500 mg rodanku sodowego (10 ml 5% roztworu NaSCN)
- 25 mg T-1824 (5 ml 0,5% roztworu barwnika w 0,9% NaCl)

Przeprowadzone badania wstępne (na 6 cielętach) dowiodły, że już w 24 godziny po dożylniej iniekcji 25 mg błękitu Evansa osocze nie zawiera śladów barwnika. W przypadku infuzji 500 mg rodanku sodowego, okres ten wynosił 36 godzin. Biorąc pod uwagę przytoczone wyniki i uwzględniając tzw. „margines bezpieczeństwa”, postanowiono dokonywać oznaczeń wielkości badanych przedziałów płynowych w odstępach minimum 48 godzin.

Objętość płynu śródmiąższowego (ISF) wyliczano jako różnicę między objętościami płynu pozakomórkowego i osocza (ISF = ECF — PV).

Stężenie sodu, potasu i chlorków w płynie śródmiąższowym obliczano za pomocą współczynników podanych przez Kokota (7), wynoszących dla Na i K 1,02, a dla Cl 1,12.

Badania przeprowadzono w 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24, 26, 28 i 31 dniu życia cieląt.

Uzyskane wyniki poddano opracowaniu statystycznemu za pomocą analizy wariancji jednoczynnikowej i testu wielokrotnego rozstępu D-Duncana.

Wyniki i omówienie

Poziom sodu w osoczu krwi badanych cieląt uległ w badanym okresie niewielkiemu podwyższeniu (tab 1). Żadna ze stwierdzonych różnic nie okazała się statystycznie istotna. Także Dalton (3) zaobserwował statystycznie nieistot-