

ANDRZEJ KOWALSKI, JERZY KALECZYC*, MACIEJ GAJĘCKI**, HENRYK ZIELIŃSKI

Poziom adrenaliny, noradrenaliny i kortyzolu u świń podczas pobierania krwi

Zakład Patofizjologii, *Katedra Anatomii Zwierząt, **Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej ART, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Summary

The level of adrenaline, noradrenaline and cortisol in pigs during blood sampling

Blood sampling, especially in young pigs, is a stressogenic procedure and brings about a release of various hormones to the peripheral blood. According to many authors blood collection, performed by means of a previously inserted catheter, has an advantage in comparison to traditional methods based on direct venapuncture. The purpose of the experiment was to carry out comparative investigations in respect to the level of adrenaline, noradrenaline and cortisol (stress hormones) during blood sampling from porkers. Two methods were used: a) a traditional one based on a direct venapuncture of the jugular anterior vein, and b) by means of a previously inserted catheter through the brachiocephalic vein to the jugular anterior vein. Blood samples were collected at 20, 40, 80, 110, 200 and 300 seconds counting the time from catching and immobilization of an animal to the end of blood sampling. The results did not reveal any significant differences in the level of the hormones in the blood samplings taken by both methods. The results proved that the stress aroused by the blood sampling was caused by catching and immobilization of animals and not by the method of blood aspiration. The traditional method of blood sampling (direct venapuncture) can be used in young animals housed in groups if the whole procedure does not last more than 22 sec., ie before the stress hormones are released in to the peripheral blood.

Pomiary poziomu hormonów stresowych (adrenaliny, noradrenaliny i kortykoidów) pełnią ważną rolę diagnostyczną w ocenie zjawisk adaptacji i stresu u zwierząt.

W celu wykonania oznaczeń hormonalnych należy pobrać krew, co jest zabiegiem stresogennym. Wywołuje on zarówno powstawanie stresu o charakterze emocjonalnym, polegającym na uwolnieniu amin katecholowych do krwi, jak i somatycznym – uwolnienie ACTH i kortykoidów (4, 9, 10, 11). Podczas pobierania krwi na zawartość katecholamin u ludzi, którzy świadomie uczestniczą w zabiegu, stosuje się 15 minutowe wyczekiwanie pomiędzy wkłuciem igły do naczynia a pobraniem krwi w celu opadnięcia emocji powodowanych zabiegiem i stabilizacji katecholamin do rzeczywistego ich poziomu (14).

U zwierząt, u których w sposób naturalny atut świadomości jest wyeliminowany, kluczowym problemem w tych badaniach jest sposób wykonania zabiegu pobierania

krwi do oznaczeń hormonalnych, tak, by nie wpłynął on na ustalenie faktycznej zawartości katecholamin i kortykoidów i nie wypaczył sensu badania.

Ogólnie panuje zgodność na temat stresogenności zabiegu pobierania próbek krwi. Większa część autorów wyraża jednak przekonanie, że pobieranie krwi przez kateter jest mniej lub niemal w ogóle bezstresowym sposobem wykonania tego zabiegu, zwłaszcza przy zastosowaniu własnych metod kaniulizacji naczyń (8, 11, 13, 15, 16, 17). Podstawową zasadą technik kaniulizacji jest wprowadzenie kateteru przez naczynia powierzchowne do naczyń większych, głębiej położonych oraz ustalenie i zabezpieczenie jego końca wyprowadzonego ponad powierzchnię skóry. Jednak wadą wszystkich, nawet najlepiej opracowanych metod pobierania krwi przy pomocy kateteru, jest ich pracochłonność związana z operacyjnym zabiegiem implantacji kateteru. Ponadto, niemal wszystkie dotyczą zwierząt dorosłych (np. macior), które przyzwyczajone są do pojedynczych stanowisk z uwiązami, gdzie nie występuje problem chwytania zwierzęcia do zabiegu. U zwierząt młodych (prosięta, warchlaki) utrzymywanych grupowo, w badaniach nad stresem i adaptacją kateteryzacja napotyka na znaczne trudności z trzech względów: trudności utrzymania wystających z grzbietu kaniul wobec skłonności młodych zwierząt w kojcu do wzajemnego ich wygryzania, czego prawdopodobnym powodem jest zapach krwi, ewentualne oddzielanie wcześniej utrzymywanych grupowo młodych zwierząt w celu ochrony kaniuli powoduje dodatkowy stres samotności zmieniający status badanych hormonów, okres pooperacyjny (po umieszczeniu kateteru) sprzyja niestabilności katecholowej. Wychodząc z założenia, że w zabiegu pobierania krwi, zwłaszcza u młodych świń utrzymywanych grupowo, można wyróżnić dwie fazy: unieruchomienia zwierzęcia i pobrania krwi przez bezpośrednie nakłucie naczynia lub przez uprzednio wprowadzony kateter, Kowalski i wsp. (9) opracowali własną metodę pobierania krwi przez bezpośrednie nakłucie żyły czczej przedniej u prosiąt, warchlaków i macior. Metoda ta polega na szybkim, w ciągu 20-22 sek. pobraniu krwi. licząc czas od wejścia do boksu i pierwszego kontaktu ze zwierzęciem do zakończenia zbiórki krwi w wymaganej jej objętości. Zasada tej metody opiera się na pobraniu próbki krwi zanim nastąpi wyrzut i pojawienie się we krwi obwodowej dodatkowej, przewyższającej stan fizjologiczny puli hormonów katecholowych (20-22 sek.) i kortykoidów (40-45 sek.). Sposób ten sprawdził się w licznych badaniach przeprowadzonych w warunkach terenowych i laboratoryjnych, zarówno u młodych osobników jak i u dorosłych macior (5, 6, 7, 10).

Wobec nielicznych badań porównawczych obydwu metod (1, 2) oraz wskutek krytycznej oceny przydatności szybkiej metody pobierania krwi sposobem tradycyjnym przez nakłucie głębokiego naczynia żylnego, wykonano badania dynamiki uwalniania adrenaliny, noradrenaliny i kortyzolu pod wpływem zabiegu pobierania krwi metodą tradycyjną i od zwierząt katetyzowanych w celu porównania stresogenności obydwu metod.

Materiał i metody

Doświadczeniem objęto 6 warchlaków o masie ciała 28-33 kg, które były katetyzowane metodą Kotwicy i wsp. (8); kaniulę wprowadzono przez żyłę odgłowowo-ramieniową (*v. cephalica humeri*) do żyły czczej przedniej (*v. cava anterior*), wolny jej koniec przeprowadzając pod skórą i fiksując na grzbiecie.

Po pięciu dniach od katetyzacji przeprowadzono dwie serie badań. Podczas pierwszej pobierano próbki krwi do strzykawki poprzez kaniulę do oznaczeń hormonalnych w następującym czasie (licząc jego upływ od momentu podejścia i uchwycenia zwierzęcia): do 22 sek., 40 sek., 80 sek., 110 sek., 200 sek., 300 sek.

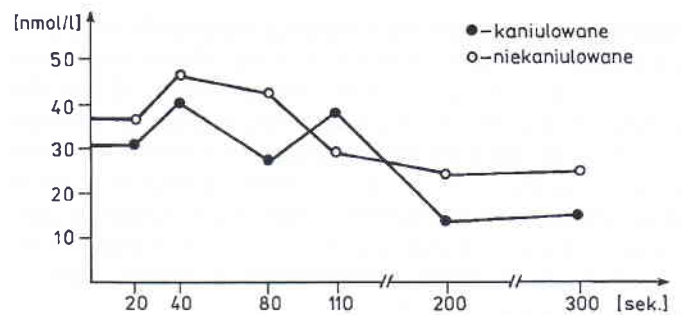
Po upływie dwóch dni od tych samych zwierząt utrzymujących nadal katetery, w tym samym pomieszczeniu i o tej samej porze doby pobierano krew tradycyjną metodą nakłucia igłą żyły czczej przedniej w taki sposób, by z raz wprowadzonej do naczynia igły zbierać krew w identycznym czasie jak w serii pierwszej (w międzyczasie zamykając wyptyw strumienia krwi). Całość badań powtórzono po upływie 3 dni. Od wykonania operacji wszczepienia, katetery przepłukiwano 5-6 razy na dobę roztworem heparyny w soli fizjologicznej.

W pobranych próbkach krwi oznaczano poziom adrenaliny i noradrenaliny (3) oraz kortyzolu (12).

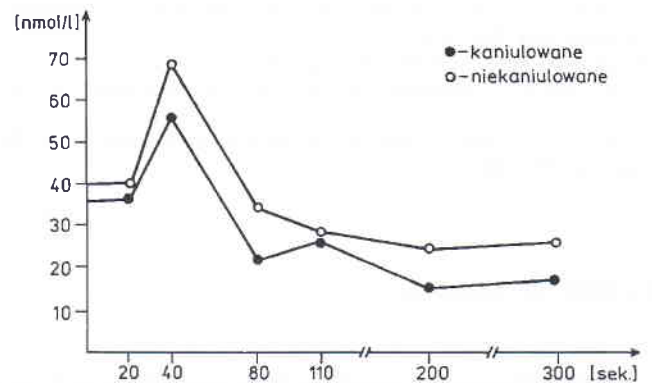
Otrzymane wyniki poddano procedurze statystycznej analizy wariancji oraz testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

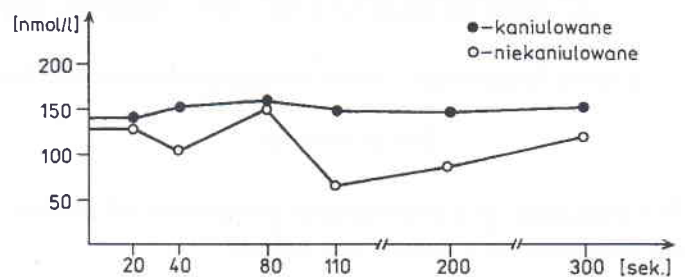
Wyniki badań (ryc. 1, 2, 3) wykazują podobny przebieg krzywych poziomu badanych hormonów, co świadczy o podobnej reakcji zwierząt na zabieg pobierania krwi, zarówno przez uprzednio wprowadzony kateter, jak i na zabieg wykonywany metodą tradycyjną (nakłucia igłą żyły czczej przedniej w czasie nie przekraczającym 22 sek.). Ponadto, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy poziomami hormonów przy obydwu metodach pobrania krwi w obrębie analogicznych czasów pobrania. Wskazuje to, że nie sam sposób uzyskiwania krwi jest stresogenny lecz podejście, uchwycenie i unieruchomienie zwierzęcia do zabiegu. Szczyt wydzielania katecholamin następował po upływie ok. 40 sek. a kortyzolu po upływie 80-110 sek. i po 300 sek. Wyniki te potwierdziły dane uzyskane przez Kowalskiego i wsp. (9) dotyczące zmian zawartości badanych hormonów we krwi powodowanych zabiegiem pobierania metodą tradycyjną. Ponadto, wskazują na identyczną stresogenność tego zabiegu dokonywanego metodą z wcześniej wprowadzonym kateterem, co ze względu na praco- i czasochłonność oraz poniesione koszty operacji oraz częstej obsługi implantowanych kateterów (przepłukiwanie w celu zapobieżenia powstawaniu zakrzepów w kateterze i katetyzowanym naczyniu) w przypadku stosowania tej metody u młodych świń dyskwalifikuje ten sposób pobrania. Dodatkowe trudności stwarza zmiana behawioru rozdzielonych (w celu ochrony kaniul) do pojedynczych kojców zwierząt, co również wpływa na zmiany poziomu hormonów stresowych. Prócz tego, badania wykazały trudne do interpretacji, ale charakterystyczne dla sytuacji stresu ostrego



Ryc. 1. Poziom adrenaliny u warchlaków podczas zabiegu pobierania krwi metodą tradycyjną i z zastosowaniem kaniuli



Ryc. 2. Poziom noradrenaliny u warchlaków podczas zabiegu pobierania krwi metodą tradycyjną i przez kaniulę



Ryc. 3. Poziom kortyzolu u warchlaków podczas zabiegu pobierania krwi metodą tradycyjną i przez kaniulę

wysokie wartości uzyskanych wyników, prawdopodobnie wskutek utrzymującej się pooperacyjnej, rozchwianej homeostazy pod względem zawartości katecholamin i kortykoidów.

Analogiczny brak przewagi metod z użyciem naczyniowej kaniuli opisali Baldi i wsp. (1) w jedynej (w dostępnym piśmiennictwie) doświadczalnej pracy na ten temat. Autorzy ci porównali poziomy glukozy, białka, LDH, CK i (jako jedyni) kortyzolu we krwi świń pobieranej bezpośrednim nakłuciem żyły czczej przedniej i przez uprzednio implantowaną kaniulę. Wykazali oni, że tylko różnice poziomu LDH i CK wskazują na korzyść metod katetyzacyjnych podając w uzasadnieniu, że zawartość CK w pobranej próbce krwi wzrasta w związku ze zniszczeniem komórek mięśni przez igłę wprowadzaną do głęboko położonego naczynia. Wzrost LDH interpretowali zmęczeniem zwierzęcia unieruchamianego do zabiegu. Znaczącym był jednak fakt braku różnic w zawartości kortyzolu (w obu przypadkach ok. 120 nmol/l), którego poziom – według naszej oceny – osiągnął wartości charakterystyczne dla stresu ostrego, co było wynikiem zbyt długiego czasu trwania zabiegu pobierania krwi zarówno metodą tradycyjną jak i przez kaniulę (ok. 2 min.).

Podsumowując wyniki można stwierdzić, że polecane przez wielu autorów pobieranie próbek krwi metodami katety-

zacyjnymi nie sprawdza się w każdych warunkach, zwłaszcza u młodych zwierząt w chowie kojcowym. Metoda tradycyjna pobierania krwi z zachowaniem czasu pobrania (22 sek. dla katecholamin i 40 sek. dla kortyzolu), jakkolwiek również posiada wady, gdyż nie zawsze udaje się zachować określony reżim czasu oraz wymaga dużej rutyny i koordynacji wśród ekipy wykonującej zabieg pobierania krwi, wykazała nie gorszą przydatność i można ją polecić zarówno praktykom jak i naukowcom do badań hormonalnych w zakresie stresu i adaptacji u młodych świń.

Piśmiennictwo

- Baldi A., Verga M., Maffi M., Canali E., Chiaraviglio D., Ferrari C.: *Reprod. Nutr. Dev.* nr 29, 95, 1989.
- Bruss M. L.: *Am. J. Vet. Res.* 42, 528, 1981.
- Campuzano H. C., Wilkerson J. E., Horvath S. M.: *Anal. Bioch.*, 64, 578, 1975.
- DeRoth L., Vermette L., Blouin A., Lariviere N.: *Appl. Anim. Behav. Sci.* nr 3-4, 255, 1989.
- Fitko R., Kowalski A., Zieliński H.: *Medycyna Wet.* 44, 416, 1988.
- Fitko R., Kowalski A., Zieliński H.: *Medycyna Wet.* 47, 517, 1991.
- Fitko R., Kowalski A., Zieliński H.: *Medycyna Wet.* 48, 66, 1992.
- Kotwica J., Krzymowski T., Dębek J.: *Medycyna Wet.* 34, 118, 1978.
- Kowalski A., Fitko R., Zieliński H.: *Medycyna Wet.* 44, 313, 1988.
- Kowalski A., Fitko R., Roszko E.: *Acta Acad. Agric. Tech. Olst., Veterinaria*, 21, 255, 1993.
- Langner P. H., Benson G. J., Neff-Davis C., Thurmon J. C.: *Lab. Anim. Sci.* 35, 182, 1985.
- Murphy B.: *J. Clin. End.* 27, 993, 1967.
- Niiyama M., Yonemichi H., Harada E., Syuto B., Kitagawa H.: *Jpn. J. Vet. Res.* 33, 1, 1985.
- Solski J., Jusiak J., Książek A.: *Diagn. lab.* 20, 217, 1984.
- Van Leengoed L. A. M. G., de Vrey P., Verheijden J. H. M.: *J. Vet. Med.* A. 34, 649, 1987.
- Withey R. J., Willes R. F., Evans J., Bryce F. R.: *Lab. Anim. Sci.* 23, 122, 1973.
- Witzel D. A., Littledike E. T., Cook H. M.: *Cornell Vet.* 63, 432, 1973.

Adres autora: dr Andrzej Kowalski, ul. Orłowicza 35 m. 33, 10-684 Olsztyn

RAJMUND SOKÓŁ

Wpływ wielomiesięcznego pozostawiania Fluwarolu w ulu na rodzinę pszczelą

Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR-T, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn

Summary

The influence of a multimonth persistence of Fluwarol in a hive of a honey bee colony

The objective of the experiment was to evaluate the efficacy of Fluwarol for controlling *Varroa jacobsoni* and its multimonth effect on the development of a honey bee colony and queen oviposition. The experiments were done on 6 bee colonies in 3 experimental groups. Two strips of Fluwarol (250 mg of fluvalinate each) were used to control varroasis. In group I the treatment lasted for 4 weeks, in group II it lasted for 6 months. Untreated bee colonies served as a control. During the first weeks of experimentation both in group I and II a great number of *V. jacobsoni* females dropped to the bottom of the hives, bees covered the strips were devoid of food stores, the altitude of brood cells was lower, egg oviposition ceased. Colonies of group II developed weakly in the winter; at the beginning egg drone laying was noted and then oviposition ceased, one queen died. New queens introduced on the same combs laid unfertilized eggs. It may be concluded that a prolonged persistence of Fluwarol in a bee colony causes disturbances in queen oviposition and queen losses.

W ostatnich 10 latach nastąpił znaczny postęp w metodach leczenia chorób pszczół, szczególnie warrozy (4, 14). Do zwalczania tej choroby poza preparatami chemicznymi stosuje się leki roślinne, prowadzi walkę bio-

logiczną, a nawet próbuje wyhodować rasy pszczół odporne na inwazję *Varroa jacobsoni* (1, 9, 10, 15, 23).

Leki przeciwko *Varroa jacobsoni* są najczęściej podawane do ula w formie dymu (Apiwarol AS, Warrosekt, Fumilat, Folbex VA) (10, 13), syropu lub do polewania i oprysku pszczół (Aptol, Perizin liquid) (5, 6, 11, 12, 16, 18). Wymienione metody wymagają kilkakrotnego podawania leku, a nawet rozbierania gniazda. Stąd wielu pszczelarzy, szczególnie prowadzących duże pasieki towarowe uważa ten sposób zwalczania warrozy za bardzo pracochłonny. Po stwierdzeniu przez Bornecka w 1987 r. (2) skuteczności fluwalinatu do zwalczania warrozy opracowano paski z tworzywa sztucznego z naniesioną mikrowarstwą tego związku. Wykazano także, że nasączona syntetycznym pyretroidem tektura lub deszczulki mogą być też nośnikami tej substancji (17). Preparaty warrobójcze III generacji produkowane są w postaci pasków z polietylenu lub PCV i zawieszane w ulu między ramkami, a pszczoły dotykając ich powierzchni roznoszą substancję aktywną po całym ulu. Są one tak spreparowane, że w miarę ścierania przez pszczoły uwalniają ze swojej powierzchni kontrolowaną ilość akarycydu. Dzięki takiej właściwości lek skutecznie niszczy *Varroa jacobsoni* przez wiele tygodni. Pierwszym preparatem III generacji przygotowanym przez firmę SANDOZ był Api-stan (fluwalinat), a następnie Bayvarol strips firmy BAYER (flumetryna) (3, 8, 23). W Polsce duże zasługi w opracowanie i wdrożenie do produkcji leku przeciwwarrozowego zawierającego fluwalinat wniósł docent B. Śledziński z Instytutu Przemysłu Organicznego z Warszawy (20, 21).