

JÓZEF NIEZGODA, DANUTA WROŃSKA-FORTUNA, EWA WIECZOREK,  
STANISŁAW BOBEK, KRYSZYNA PIERZCHAŁA-KOZIEC

# Reakcja układu współczulno-nadnerczowego i osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej owiec na wielokrotny stres emocjonalny<sup>\*</sup>)

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, Al. Mickiewicza 24/28, Kraków

Niezgoda J., Wrońska-Fortuna D., Wieczorek E., Bobek S., Pierzchała-Koziec K.

## Response of sympatho-adrenal and hypothalamo-pituitary-adrenal axes of sheep on recurrent emotional stress

### Summary

In the performed experiments the response of sympatho-adrenal and hypothalamo-pituitary-adrenal system was evaluated in sheep stressed by repeated isolation from the flock.

Immature female sheep of the Polish Mountain breed were used. They were divided into control and experimental (isolated) groups, each of 10 animals. The sheep of the experimental group were isolated individually, three times for 180 min in 24h intervals. The blood was taken 30 minutes before, and 10, 30, 60 and 180 minutes after onset of isolation stress by means of cannula inserted into jugular vein.

The activity of the sympatho-adrenal system was demonstrated by the plasma level of adrenaline (A) and noradrenaline (NA) and activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal system by plasma level of cortisol. The concentration of catecholamines and cortisol were determined by the REA and RIA method, respectively. The highest concentration of the determined hormones was observed during the first isolation stress. The maximal level of catecholamines appeared at 10 min and cortisol between 30 and 60 min of stress. The patterns of increment in successive isolations were not altered, only the maximal levels of the hormones were reduced; the highest decline was noted in A level in lower NA and cortisol concentrations. These changes were determined by the calculated mean integrated responses; for A they were seven times and for NA and cortisol two times lower, compared to the first isolation.

It is concluded that repeated isolation stress performed in similar time intervals leads to a systematic reduction of the response of sympatho-adrenal and hypothalamo-pituitary-adrenal system. This indicates a development of adaptation processes to the applied stressor.

W czasie stresu u zwierząt następuje pobudzenie układu współczulno-nadnerczowego oraz osi przysadkowo-nadnerczowej (1, 8, 12). Uwolnienie hormonów tych układów: adrenaliny (A) i noradrenaliny (NA) oraz adrenokortykotropiny (ACTH) i kortyzolu (F) uważane jest za niespecyficzną reakcję organizmu na czynniki stresowe (6, 21). Wpływają one na zachowanie się zwierząt, czynność szeregu układów, a także na tempo metabolizmu w celu przezwyciężenia stresu lub adaptacji (4, 6, 13, 14, 19).

Wcześniejsze badania wykazały, że silnym czynnikiem stresotwórczym u owiec jest ich izolacja od stada, a gwałtowny wzrost uwalniania hormonów przez omawiane układy wskazuje na emocjonalny charakter stresu (4, 14, 18). Nie wyjaśniono jednak

przekonywująco czy owce adaptują się do tego rodzaju stresu w przypadku jego wielokrotnego powtarzania. Stwierdzono, że wielokrotne powtarzanie stresu emocjonalnego powoduje obniżenie wzrostu stężenia F (5, 12, 13, 22) przy jednakowym wzroście ACTH w osoczu krwi (5, 12). Nie określano natomiast reakcji układu współczulno-nadnerczowego. Dlatego podjęto badania, których celem było określenie aktywności układu współczulno-nadnerczowego i osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej w czasie wielokrotnie powtarzanego stresu emocjonalnego wywołanego izolacją owiec od stada.

### Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono na jarkach rasy polska owca górską utrzymywanych w standardowych warunkach pomieszczeniowych i żywieniowych. Owce po-

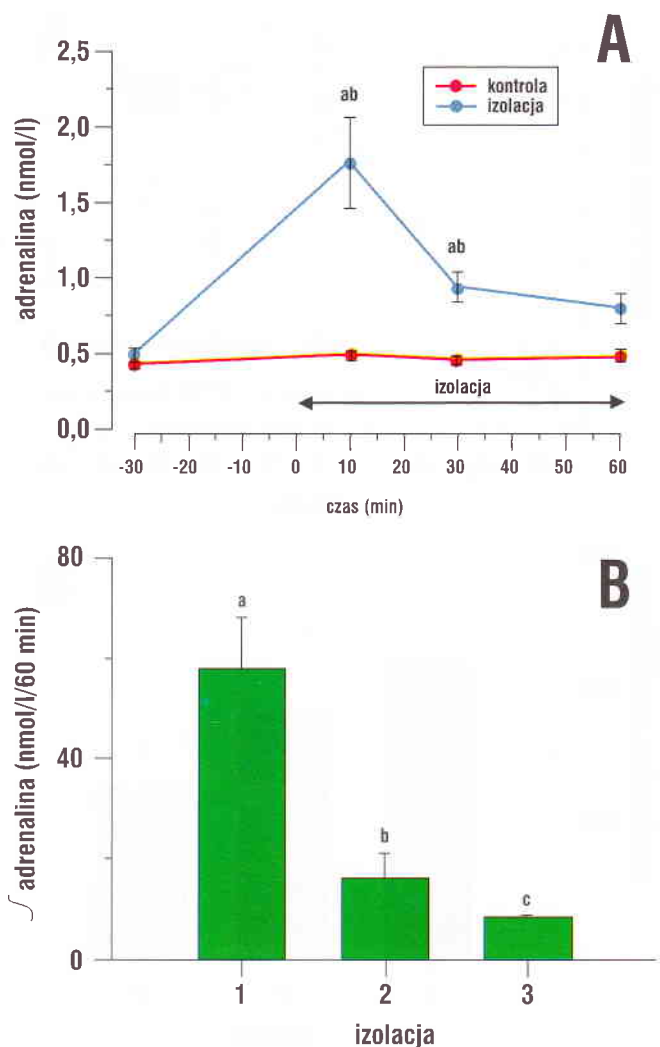
<sup>\*</sup>) Praca wykonana w ramach grantu KBN Nr 554189203

dzielono na dwie grupy po 10 szt. w każdej, kontrolną pozostającą w stadzie i doświadczalną izolowaną. Tydzień przed doświadczeniem zwierzętom wprowadzono przy znieczuleniu miejscowym (Linocainum hydrochloricum 2%, 3 ml) kaniulę polietylenową do żyły jarzmowej w celu ułatwienia pobierania krwi. Owce grupy doświadczalnej poddano trzykrotnej izolacji w oddzielnych pomieszczeniach na okres 180 minut. Przerwy pomiędzy izolacjami wynosiły 24 godziny. Krew do oznaczeń hormonów od jarek obu grup pobierano 30 min. przed oraz w 10, 30, 60 i 180 minucie stresu do próbek z EGTA i zredukowanym glutationem (do oznaczeń A i NA) lub heparyną (do oznaczeń F) i natychmiast umieszczano w łaźni lodowej. Po odwirowaniu krwi osocze zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu oznaczeń hormonów. Aminy katecholowe oznaczano metodą radioenzymatyczną przy użyciu „REA-kit, Catechola H<sup>3</sup>” (Czechy). Czulość metody wynosiła dla A – 0,37 nmol/l, a dla NA – 0,53 nmol/l. Błąd wewnątrzseryjny dla A wynosił 3,1%, a dla NA 4,2%, natomiast błąd międzyseryjny odpowiednio 4,2 i 7,4%. Kortyzol oznaczano metodą radioimmunologiczną używając zestawu „Formos Diagnostica” (Finlandia). Czulość metody wynosiła 4-7 nmmol/l, błąd wewnątrzseryjny 3,05%, a międzyseryjny 5,83%. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie stosując dwuczynnikową analizę wariancji w układzie bloków zrandomizowanych oraz test istotności Duncana (7).

W celu porównania wielkości reakcji stresowych pomiędzy poszczególnymi izolacjami obliczono średnią zintegrowaną odpowiedź (J) dla każdego badanego hormonu. Równa jest ona powierzchni pola nad podstawą, którą stanowi wartość wyjściowa (10). Istotności różnic pomiędzy wartościami J określano testem T-studenta (7).

### Wyniki i omówienie

Zmiany stężenia A i NA w osoczu krwi obrazują stan czynnościowy układu współczulno-nadnerczowego. U owiec, podobnie jak u innych zwierząt, wykazano wzrost aktywności tego układu w czasie stresu (9, 14, 16, 18). Potwierdzają to wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach. W czasie pierwszej izolacji owiec najwyższy wzrost stężenia A z wartości  $0,48 \pm 0,05$  do  $1,75 \pm 0,30$  nmol/l obserwowano w 10 minucie stresu ( $P < 0,01$ ), następnie stężenie A obniżało się, ale do końca izolacji było wyższe od początkowego (ryc. 1A). Stężenie NA przed izolacją wynosiło  $1,26 \pm 0,10$  nmol/l, najwyższą jej wartość stwierdzono w 10 min. izolacji –  $5,93 \pm 0,70$  nmol/l ( $P < 0,01$ ). W kolejnych pobraniach stężenie NA utrzymywało się na podwyższonym poziomie ( $P < 0,05$ ; ryc. 2A). Powtarzanie izolacji powodowało, przy zachowanym profilu zmian, mniejszy wzrost stężenia A i NA w osoczu krwi. Obrazują to wartości średniej zintegrowanej odpowiedzi. J<sub>A</sub> w czasie pierwszej izolacji wynosiła  $57,9 \pm 10,3$  nmol/l/60 min. i było 3,5 i 7,75 razy wyższe od stwierdzonych w drugiej i trzeciej izolacji ( $P < 0,05-0,01$ ; ryc. 1B). Wartość J<sub>NA</sub> w pierwszej izolacji wynosi-



Ryc. 1. A Zmiany stężenia adrenaliny w osoczu krwi owiec w czasie pierwszej izolacji ( $x \pm \text{SEM}$ )

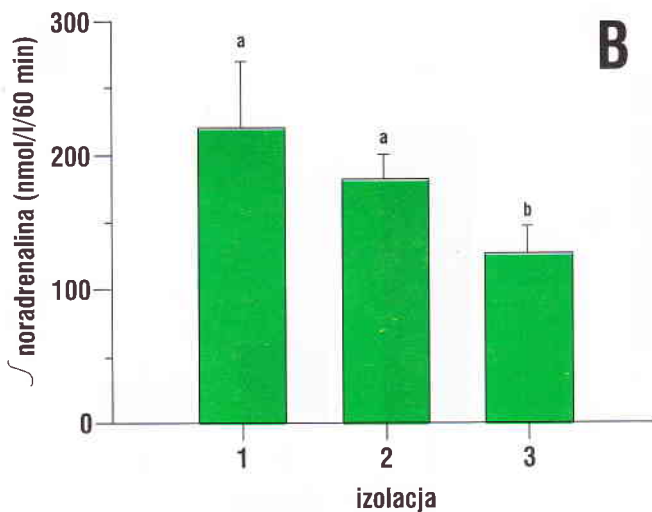
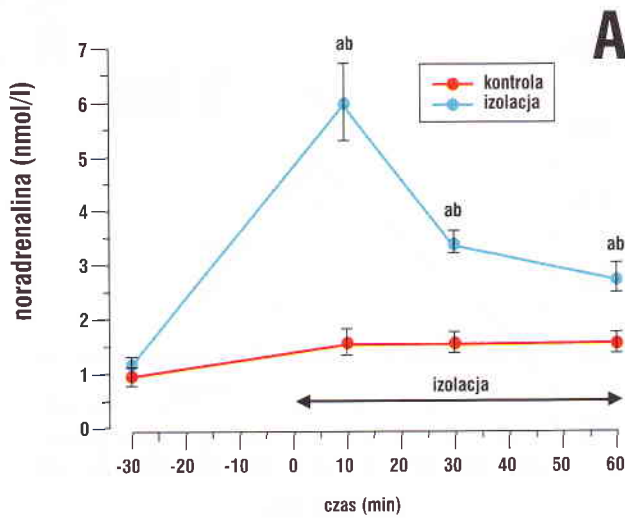
<sup>a</sup> $P < 0,05-0,01$  w stosunku do wartości początkowej

<sup>b</sup> $P < 0,05-0,01$  w stosunku do wartości kontrolnej

B Średnie zintegrowane odpowiedzi adrenaliny w trzech kolejnych izolacjach ( $x \pm \text{SEM}$ ); wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ( $P < 0,05-0,01$ )

ła  $214,7 \pm 48,1$  nmol/l/60 min. i była wyższa o 1,75 razy od stwierdzonej w trzeciej izolacji ( $P < 0,05$ ; ryc. 2B).

Dotychczasowe badania wykazały, że układ współczulno-nadnerczowy u owiec może reagować w różnym stopniu na zmniejszające się czynniki stresotwórcze (15, 18). Brak jest danych dotyczących reakcji tego układu na wielokrotnie powtarzany stresor tego samego rodzaju i wielkości. W pracy stwierdzono spadek reakcji tego układu, co obrazują wartości J<sub>A</sub> i J<sub>NA</sub>. Wskazują one na przystosowanie się owiec do powtarzającego się czynnika stresotwórczego. Otrzymane wyniki są zgodne z uzyskanymi na szczurach, u których stwierdzono również, że wielokrotnie powtarzany stresor tego samego rodzaju i wielkości powoduje zmniejszenie reakcji układu współczulno-nadnerczowego. Zmiana stresora lub jego wielkości w kolejnych powtórzeniach powoduje wzrost reakcji tego układu (11).



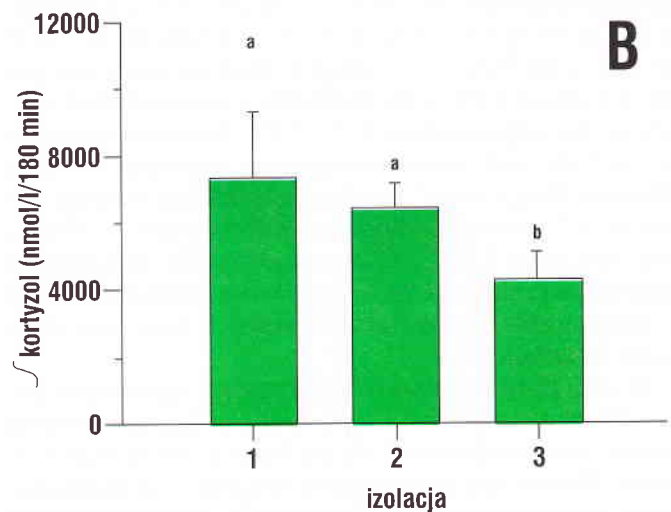
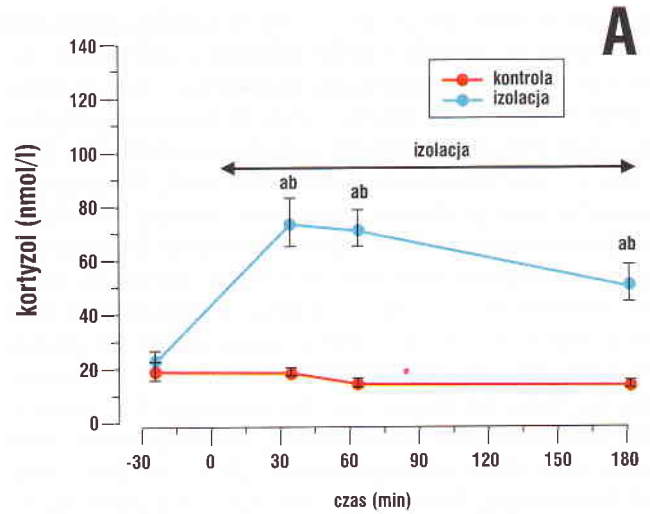
Ryc. 2. A Zmiany stężenia noradrenaliny w osoczu krwi owiec w czasie pierwszej izolacji ( $x \pm SEM$ )

<sup>a</sup> $P < 0,05-0,01$  w stosunku do wartości początkowej

<sup>b</sup> $P < 0,05-0,01$  w stosunku do wartości kontrolnej

B Średnie zintegrowane odpowiedzi noradrenaliny w trzech kolejnych izolacjach ( $x \pm SEM$ ); wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ( $P < 0,05$ )

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że izolacja owiec od stada powoduje pobudzenie osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej. W pierwszej izolacji obserwowano wzrost stężenia F w osoczu krwi z wartości  $25,3 \pm 2,8$  do  $74,6 \pm 8,8$  i  $72,5 \pm 6,8$  nmol/l w 30 i 60 minucie ( $P < 0,01$ ). W 180 minucie stresu stężenie F wynosiło  $51,1 \pm 6,9$  nmol/l i było nadal wyższe od wartości początkowej i kontrolnej ( $P < 0,05$ ; ryc. 3A). Wzrost stężenia kortyzolu jest uzależniony od czasu trwania izolacji oraz od częstości jej powtarzania. W czasie długotrwałej izolacji owiec od stada stężenie kortyzolu stopniowo obniża się (19). Powtarzanie izolacji w odstępach kilkudniowych nie zmienia lub wzmacnia reakcję kory nadnerczy (13, 22), natomiast w krótkotrwałych odstępach czasu reakcja kory nadnerczy ulega wyraźnemu obniżeniu (5, 16, 22). W pracy powtarzanie izolacji dzień po dniu powodowało zmniejszenie reakcji osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej. Obrazuje to wartość  $|F|$ , która w



Ryc. 3. A Zmiany stężenia kortyzolu w osoczu krwi owiec w czasie pierwszej izolacji ( $x \pm SEM$ )

<sup>a</sup> $P < 0,05-0,01$  w stosunku do wartości początkowej

<sup>b</sup> $P < 0,05-0,01$  w stosunku do wartości kontrolnej

B Średnie zintegrowane odpowiedzi kortyzolu w trzech kolejnych izolacjach ( $x \pm SEM$ ); wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ( $P < 0,05$ )

pierwszej izolacji wynosiła  $7294,5 \pm 95,3$  nmol/l/180 min. i była wyższa o 1,75 raza od stwierdzonego w trzeciej izolacji ( $P < 0,01$ ; ryc. 3B). Obserwowany spadek reakcji osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej można tłumaczyć mechanizmem ujemnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy korą nadnerczy, a przysadką lub podwzgórzem (1, 8). Mechanizm ten ułatwia adaptację zwierząt do długotrwałego lub często powtarzanego czynnika stresotwórczego.

W czasie stresu następuje także wzrost uwalniania opioidów (3, 20). Wykazano, że egzogenne opioidy hamują uwalnianie kortyzolu, a także kortykoliberyny (CRH) u owiec. Działanie to jest znoszone przez naloxon, związek blokujący receptory opioidowe (17). Badania Coppingera i wsp. (5) wykazały, że wielokrotne powtarzania stresu izolacji i unieruchomienia nie zmienia uwalniania ACTH. Sugeruje to zmniejszenie wrażliwości kory nadnerczy na ACTH w czasie wielokrotnego stresu. Nie potwier-

dziły tego jednak badania Niezgody i wsp. (16), którzy stwierdzili, że egzogenne ACTH podane owcom dwukrotnie izolowanym powoduje wzrost stężenia kortyzolu w osoczu krwi, wyższy od obserwowanego w pierwszej izolacji i u owiec kontrolnych.

### Wnioski

1. Wielokrotne powtarzanie stresu emocjonalnego wywołanego izolacjami owiec od stada powoduje obniżenie reakcji układu współczulno-nadnerczowego i osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej.

2. Obniżenie reakcji omawianych układów w czasie wielokrotnie powtarzanych stresów emocjonalnych wskazuje na adaptacje owiec do stosowanego czynnika stresotwórczego.

### Piśmiennictwo

1. Axelrod J., Reisine T. D.: Science 224, 452, 1984.
2. Bobek S., Niezgoda J., Pierzchała K., Sechman A., Wrońska D.: Egypt J. Vet. Sci. 24, 2, 125, 87.
3. Boone J. B., Sherraden T., Pierzchała K., Berger R., Van Loon G. R.: J. Appl. Physiol. 73, 1, 388, 1992.
4. Corcam M. S., Ranson M., Imlah P., Goddard P. J., Burrells C., Harkiss G. D.: Anim. Prod. 58, 389, 1994.

5. Coppinger T. R., Minton J. E., Reddy P. G., Blecha F.: J. Anim. Sci. 69, 2808, 1991.
6. Dantzer R., Mormede P.: J. Anim. Sci. 57, 6, 1983.
7. Eland R.: Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczeń zootechnicznego. PWN Warszawa, 1964.
8. Engler D., Liu J., Clarke I. J., Funder J. W.: Trends Endocrinol. 5, 272, 1994.
9. Houpt K., Kendrick K. M., Parrot R. F., De la Riva C. F.: Hor. Met. Res. 20, 189, 1988.
10. Klein A. H., Fisher D. A.: Endocrinol. 106, 697, 1980.
11. McCarty R.: Neurosci. 6, 197, 1994.
12. Minton J. E.: J. Anim. Sci. 72, 1991, 1994.
13. Niezgoda J., Wrońska D., Pierzchała K., Bobek S., Kahl S. J.: Vet. Med. A 34, 734, 1987.
14. Niezgoda J., Wrońska-Fortuna D., Bobek S., Sechman A., Jurani M., Sobstel P.: Acta Agr. Sil. Ser. Zoot. 30, 101, 1992.
15. Niezgoda J., Bobek S., Wrońska-Fortuna D., Wierchoś E.: J. Vet. Med. A40, 631, 1993.
16. Niezgoda J., Wrońska-Fortuna D., Wieczorek E., Bobek S., Pierzchała-Koziec K.: Acta Agr. Sil. Ser. Zoot. 34, 77, 1996.
17. Parrot R. F., Goode J. A.: Gen. Pharmac. 24, 1, 101, 1993.
18. Parrot R. F., Misson B. H., De la Riva C. F.: Res. Vet. Sci. 56, 234, 1994.
19. Pierzchała K., Niezgoda S., Bobek S.: Zbl. Vet. Med. A 32, 140, 1985.
20. Pierzchała K., Van Loon G. R.: J. Clin. Invest. 85, 861, 1990.
21. Stephens D. B.: Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 24, 179, 1980.
22. Wrońska D., Niezgoda J., Pierzchała K., Sechman A., Bobek S., Hamid A. B.: Endokrynol. Pol. 34, 567, 1991.

Adres autora: prof. dr hab. Józef Niezgoda, ul. Armii Krajowej 87/16, 30-150 Kraków

## Sekcja Farmakologii i Toksykologii

### Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych

organizuje wraz z

### Państwowym Instytutem Weterynaryjnym

sesję naukową nt.

## ANALIZA SUBSTANCJI SZKODLIWYCH W ŻYWNOŚCI I PASZACH: DOBÓR METOD, ZAPEWNIENIE JAKOŚCI

Sesja odbędzie się w dniach 24-25 września 1998 r. o godz. 10.00 w Weterynaryjnym Centrum Kształcenia Podyplomowego PIWet. w Puławach.

W czasie Sesji wygłoszone zostaną referaty przez czołowych specjalistów w zakresie analityki pozostałości chemicznych. Oprócz referatów prezentowane będą postery doniesień zgłoszonych przez uczestników. Materiały w formie referatów i doniesień będą udostępnione w czasie sesji.

Opłata uczestnictwa wraz z materiałami wynosi 50,- zł. Wpłata na konto Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Bank BGŻ O/Puławy 20301547-1326-2706-11 z dopiskiem „Sesja analityczna”.

Osoby zainteresowane udziałem w Sesji proszone są o wypełnienie Karty Zgłoszenia (u organizatorów) i przesłanie jej na adres Komitetu Organizacyjnego do dnia 15 kwietnia 1998 r.

Organizatorzy zapewniają wyżywienie oraz noclegi w Centrum Kształcenia Podyplomowego PIWet. Szczegółowe informacje przesyłane będą osobom zgłaszającym uczestnictwo. Organizatorzy nie pokrywają kosztów delegacji.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Zakład Farmakologii i Toksykologii PIWet  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy  
tel. (081) 886 30 51 w. 141, fax (081) 886 25 95  
e-mail zmudzki@piwet.pulawy.pl

Komitet Organizacyjny

Doc. dr hab. T. Szprengier-Juszkiewicz

Przewodniczący

Sekcji Farmakologii i Toksykologii PTNW

Prof. dr hab. Jan Żmudzki