

Adam KĄDZIOŁKA, Władysław ŻARÓW

Wpływ stresu na zjawisko hiperlipidemii u świń

Влияние стресса на явление гиперлипидемии у свиней

The Influence of Stress on Hyperlipidemy in Swine

Zagadnieniu mobilności lipidów i ich przemiany w stresie u zwierząt poświęcono dotychczas mniej uwagi niż zaburzeniom przemiany białkowej lub węglowodanowej. Tymczasem sprawa wtórnych hiperlipidemii prowokowanych napięciem stresowym, w następstwie zwielokrotnionego wyrzutu amin katecholowych do krwi, uruchamiających lipolizę i hiperlipidemię transportywną posiada nie tylko znaczenie poznawcze. Zapobieganie stresowi i działaniu głównie noradrenaliny uruchamiającej lipazę lipoproteidową i zjawisko lipolizy tkanki tłuszczowej ma również wartość praktyczną.

Mając na względzie fakt szczególnej podatności świń na działanie stresorów, w tym psychogennych (5, 6) i zjawisko wtórnej hiperlipidemii, postanowiono poddać 3-krotnej analizie niektóre wskaźniki tłuszczowe surowicy krwi świń rzeźnych w tzw. późnym okresie obrotu trzodą chlewną, mianowicie: a) w tuczarni, b) po transporcie w magazynie żywca na terenie zakładów mięsnych, c) po uboju.

MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiło 14 świń, samic, rasy wielkiej białej polskiej (wbp), w wieku ok. 8–9 miesięcy, ciężaru ok. 100 kg. Zwierzęta pochodziły z tuczarni w R. Warunki środowiskowe zostały opisane w pracy Nowaka (9). Odległość między tuczarnią a zakładami mięsnymi wynosiła 25 km. Zwierzęta transportowano samochodem. Czas dostawy przypadł na miesiące letnie, godziny ranne. Grupa świń wybranych losowo była trzymana w 2 okólnikach. Nie dostrzeżono między zwierzętami wzajemnego antagonizmu.

Krew pobierano z naczyń ogonowych, w tuczarni na 2 godziny przed załadowaniem i transportem, w magazynie żywca, po 24-godzinny wypoczynku i przełodzeniu, w hali ubojowej, w chwili śmierci klinicznej. Świnie te celowo traktowano brutalnie, popędzano je „elektrycznym poganiaczem”.

W surowicy krwi oznaczano poziom następujących związków tłuszczowych: 1) cholesterolu całkowitego (ch.c.) i wolnego (ch.w.) metodą Zlatkisa i wsp., estrowego (ch.e.) z różnicą między cholesterolem całkowitym a wolnym; 2) wolnych kwasów tłuszczowych (w.k.t.) metodą Duncombe'go; 3) tłuszczów całkowitych (t.c.) metodą Zöllnera i Kirscha; 4) fosfolipidów (flp) metodą Connerty'ego; 5) frakcji lipidowych metodą elektroforezy bibułowej w buforze weronalowym z dodatkiem 1% albuminy bydlęcej o wartości pH 8,6 i sile jonowej 0,1 V, w czasie której uzyskano rozdział: chylomikronów (0), pre- i beta (VLDL i LDL) oraz alfa-lipoproteidów (HDL). Paski barwiono Sudanem B. Poszczególne frakcje eluowano 20% kwasem octowym w metanolu. Ekstynksje oznaczano na spektrofotometrze „Specol” stosując odpowiednie długości fal dla poszczególnych składników tłuszczowych.

Lipidy surowicy krwi rozdzielano dodatkowo metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach DC Fertigplatten Kieselgel firmy Merck. Dokładny opis metodyczny podano w innej pracy (14).

Wartości liczbowe lipidów oznaczonych metodą biochemiczną poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu t-Studenta i zamieszczono w tab. 1.

Tab. 1. Stężenie lipidów surowicy krwi świń w poszczególnych etapach badawczych
Lipids level in blood serum of swine in individual stages of investigation

Związki lipidowe	M	SD	SE	V	P	Etap	
1. Cholesterol całkowity w mg/100 ml	124,3	19,1	5,11	15,4	>0,10	1	
	127,8	16,8	4,48	13,1	<0,01	2	
	144,1	17,5	4,69	12,2	<0,001	3	
2. Cholesterol wolny w mg/100 ml	30,96	8,38	2,24	21,1	>0,060	1	
	33,89	6,48	1,73	19,1	≈0,09	2	
	38,33	7,59	2,03	19,8	<0,01	3	
3. Cholesterol estrowy w mg/100 ml	93,39	15,31	4,09	16,04	<0,04	1	
	93,94	12,22	3,26	13,0	<0,01	2	
	105,75	11,61	3,10	11,0	<0,001	3	
4. Wolne kwasy tłuszczowe w mEq/l	325,0	52,5	14,02	16,02	≈0,08	1	
	360,0	55,9	14,94	15,5	<0,01	2	
	425,0	49,6	13,24	11,7	<0,001	3	
5. Tłuszcze całkowite w mg/100 ml	398,0	88,7	23,7	22,3	>0,50	1	
	422,0	78,0	20,8	18,5	≈0,09	2	
	483,0	94,1	25,1	19,5	<0,001	3	
6. Fosfolipidy w mg/100 ml	138,9	17,6	4,71	12,7	<0,05	1	
	131,3	19,7	5,26	15,0	>0,15	2	
	135,3	17,3	4,63	12,8	≈0,07	3	
7. Lipoproteidy w % frakcja alfa	48,11	5,51	1,47	11,5	>0,10	1	
	48,52	3,85	1,03	7,0	≈0,09	2	
	40,99	7,70	2,06	18,8	<0,001	3	
	frakcja beta	36,15	3,39	0,91	9,4	<0,02	1
		37,41	4,29	1,15	11,5	≈0,09	2
		41,40	5,39	1,44	13,0	<0,001	3
	frakcja 0	15,74	5,21	1,39	33,1	>0,50	1
		14,06	4,35	1,16	31,0	>0,80	2
		17,61	5,07	1,35	28,8	>0,40	3

M — średnia arytmetyczna, SD — odchylenie standardowe, SE — średni błąd średniej, V — współczynnik zmienności, P — prawdopodobieństwo, 1 — etap w tu czarni, 2 — etap w magazynie żywca, 3 — etap w hali ubojowej.

M — mean value, SD — standard deviation, SE — standard error of the mean, V — coefficient of variability, P — probability, 1 — stage on the farm, 2 — stage in a slaughter house, 3 — stage in a slaughter house.

WYNIKI

1. Cholesterol całkowity; poziom ch.c. w surowicy krwi świń z tuczarni (analiza 1) wynosił średnio 124,3 mg/100 ml surowicy. W magazynie żywca (analiza 2) — 127,8 mg/100 ml. Wzrost ten był nieznaczny i wybitnie losowy. W krwi pobranej po uboju (analiza 3) osiągnął poziom 144,1 mg/100 ml. Wzrost ch.c., jaki wystąpił w tym czasie w odniesieniu do analizy 1 był statystycznie wysoce znamienny.

2. Cholesterol wolny; średni poziom u zwierząt przebywających w tuczarni wynosił 31,0 mg/100 ml, w magazynie żywca — 33,9 mg/100 ml, w hali ubojowej — 38,3 mg/100 ml. Wzrost w kolejno notowanych badaniach był statystycznie znamienny.

3. Cholesterol estrowy; średni poziom u świń przebywających w tuczarni kształtował się na poziomie 93,4 mg/100 ml, w magazynie żywca — 93,9 mg/100 ml, w hali ubojowej — 105,8 mg/100 ml. Tylko w analizie 3 poziom ch.e. uległ miernemu wzrostowi.

4. Wolne kwasy tłuszczowe; średni poziom w.k.t. wzrastał z każdym etapowym badaniem i wyjściowo u świń przebywających w tuczarni wynosił 325 mEq/l, w magazynie żywca — 360 mEq/l i w hali ubojowej — 425 mEq/l. Wzrost między poszczególnymi analizami był wysoce znamienny.

5. Tłuszcze całkowite; średni poziom t.c. kształtował się następująco, u zwierząt przebywających w tuczarni — 398 mg/100 ml, w magazynie żywca — 422 mg/100 ml, w hali ubojowej — 483 mg/100 ml. Wzrost poziomu t.c. w kolejnych analizach był statystycznie wysoce znamienny.

6. Fosfolipidy; w obrębie flp nie dostrzeżono określonych przesunień, średni poziom utrzymywał się na wysokości 135 mg/100 ml surowicy.

7. Lipoproteidy; frakcja chylomikronowa — 0 (lp), u świń przebywających w magazynie żywca uległa pewnemu obniżeniu, zaś po uboju podwyższeniu, nie dochodząc wartości wyjściowych. Frakcje pre- i beta-lipoproteidów oznaczane łącznie wykazywały zróżnicowanie. W kolejnych analizach wartości w odsetkach kształtowały się następująco: 36,2%, 37,4%, 41,4%. Wzrost ten okazał się statystycznie wysoce istotny. Frakcja alfa-lipoproteidów w analizie 1 wyniosła 48,1%, w 2 48,5% i w 3 41,0%.

Tab. 1 uzupełnia podane wyniki. Podobnie czyni to analiza chromatograficzna, przy pomocy której wykazano wyraźny wzrost mobilności takich związków lipidowych, jak: wolnego cholesterolu, trójglicerydów i w mniejszym stopniu cholesterolu estrowego.

OMÓWIENIE

Z obserwacji wynika, że oznaczanie związków tłuszczowych w surowicy krwi zwierząt znajdujących się pod naporem stresorów jest wiarygodnym testem oceny zjawisk katabolicznych zainicjowanych neurohormonalnie, w drodze uczynnienia układu współczulnonadnerczowego w stresie (2, 6, 11, 12). U badanych świń zarówno manipulacja transportowa, jak i głównie okres przedubojowy wyzwalają bodźce stresotwórcze, które wywołują w fazie alarmowej stresu zespół zaburzeń metabolicznych, wyrażonych wyraźnym zachwianiem równowagi lipemicznej w ustroju. Najbardziej istotne przesunięcia wystąpiły w stężeniu cholesterolu wolnego, całkowitego, wolnych kwasów tłuszczowych, tłuszczu całkowitego oraz lipoproteidów, zwłaszcza frakcji pre- i beta.

Porównanie wyników ilościowych z jakościowymi uzyskanymi metodą chromatografii cienkowarstwowej, która podkreśliła wzrost poziomu cholesterolu wolnego, trójglicerydów i częściowo cholesterolu estrowego, wskazywało, że związki te osiągnęły najwyższe stężenie w surowicy krwi w czasie trwania maksymalnego naporu stresora psychogenego — strachu, tj. przed ubojem. Poziom lipidów krwi od 1 pobrania krwi w tuczarzni do 3 w czasie uboju wyraźnie i statystycznie znamienne wzrastał. Ujawniła się zatem adekwatność stresora psychogenego i ruchu lipidów krwi.

Wykazana hiperlipidemia posiadała jednak charakter umiarkowany. Na jej obecność złożył się wzrost wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu całkowitego i wolnego oraz frakcji pre- i beta-lipoproteidowych. U świń opasowych lub starych wyeksploatowanych samic poziom lipidów krwi jest często wyższy, zwłaszcza gdy występuje sprzężenie zaburzeń metabolicznych ze zmianami miażdżycowymi w aorcie i naczyniach wieńcowych serca (7). Świnie typu mięsno-tłuszczowego cechują się wysoką pobudliwością nerwową oraz nikłą zdolnością termoregulacyjną (8). W rozwoju ontogenetycznym u tego typu zachodzą dysproporcje między intensywnym wzrostem ciężaru ciała a wielkością serca.

W transporcie oraz w pobudzeniu stresowym, zwłaszcza pochodzenia mózgowego, zapoczątkowanym w reakcji alarmowej wyrzutem amin katecholowych rozwija się tachycardia, tachypnoe, hypoxia, hyperthermia, co w konsekwencji prowadzi do duszności, niedotlenienia i sinicy. W mitochondriach włókien mięśniowych świni mało jest enzymów utleniających, stąd energia w postaci ATP pokrywana jest beztlenowym rozkładem glukozy. Rośnie zatem kwasica metaboliczna, wskutek wyczerpania się zasobów węglowodanowych. We krwi gromadzi się kwas mlekowy, a także wzrasta poziom wolnych kwasów tłuszczowych, w następstwie lipolizy tkanki tłuszczowej (2, 3).

Lipoliza tkanki tłuszczowej i wynikający z tego stan hiperlipidemii transportywnej zależy w stresie od wzmożonego działania noradrenaliny, która znajduje się w zakończeniach beta-adrenergicznych. Noradrenalina aktywizując lipazę lipoproteidową ściany naczyń włosowatych tkanki tłuszczowej przyczynia się w pierwszym rzędzie do demobilizacji zapasów tłuszczowych i strat ciężaru ciała. Dochodzi do wzrostu poziomu wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu oraz trójglicerydów transportowanych we krwi przez apoproteidy we frakcjach lipoproteidowych prebeta (VLDL) i beta (LDL). Za tego rodzaju mechanizmem lipolitycznym przemawiają badania doświadczalne Cunnninghama i Frienda oraz Perssona (4, 10), którzy wykazali u świń zdolność uruchamiania lipazą lipoproteidową lipolizy, po pozajelitowej iniekcji amin katecholowych. Aktywność lipolityczna jest szczególnie wysoka u świń mięsnych o wadze 90—100 kg (8, 13).

Swój udział w lipolizie ma aktywizacja endogennych lipaz spowodowana hipoglikemią głodową. W tym przypadku ujawnia się szczególna aktywność lipazy lipoproteidowej. Po 10-godzinym głodzeniu poziom wolnych kwasów tłuszczowych może wzrosnąć ok. 50%, a po 24-godzinnym nawet do 100%. Wysoki poziom w.k.t. w ustroju, który znajduje się w stanie względnej równowagi, utrzymuje się bardzo krótko, trwa zaledwie kilka minut, ponieważ wykazują one dużą zdolność energetyczno-metaboliczną (1). Z tego wynika, że 24-godzinne głodzenia badanych świń mogło przyczynić się też do wzrostu w.k.t. we krwi. Zaznacza się, że poziom tych związków wysoce i znamienne różnił się właśnie w 3 analizie i był niewątpliwie stymulowany fazą szoku reakcji alarmowej.

Tylko pewna część w.k.t. zostaje przetwarzana w energię, reszta podlega wbudowaniu do trójglicerydów i fosfolipidów oraz estrów cholesterolu, w tej postaci pojawia się we krwi obwodowej.

Przedstawiony (w pewnym uproszczeniu) mechanizm lipolizy przyczynia się do stosunkowo szybkiego i dość długo utrzymującego się w stresie stanu hiperlipidemii. Zjawisko hiperlipidemii i jego ocena, jak wolno sądzić, na podstawie piśmiennictwa i spostrzeżeń własnych może posłużyć za wartościowy test charakterystyki stanu stresowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamczyk A.: Metabolizm ciał tłuszczowych osocza i ich udział w gospodarce tłuszczowej. *Przegl. Lek.*, 33, 740, 1976.
2. Charvat J.: *Život, adaptace a stres*. Avicennum, Praha, 1970.
3. Ciświcka-Schneiderman M.: Gospodarka lipoproteidowa — aspekty fizjologiczne i kliniczne. *Przegl. Lek.*, 33, 744, 1976.

4. Cunningham H. M., Friend D. W.: Influence of epinephrine, norepinephrine and nicotine on blood levels of glucose, free fatty acids and amino-nitrogen in pigs. *J. Am. Sci.*, **24**, 41, 1965.
5. Fitko R.: Problemy stresu i adaptacji u zwierząt. *Nowości Wet.*, **1**, 19, 1974.
6. Juskiewicz T., Służewski Z.: Wpływ chlorpromazyny, awiomaryny i psychedryny na niektóre wskaźniki fizjologiczne i biochemiczne u świń kontrolnych i transportowanych. *X Zjazd Naukowy PTF Lublin*, IX, 1966.
7. Kądziołka A., Gąsior W.: Zjawisko hiperlipoproteidemii i miażdżycy naczyń wieńcowych serca świń-samic. *Med. Wet.* (w druku).
8. Mersmann H. J., Brown J. L., Underwood M. C., Stanton H. C.: Catecholamine-induced lipolysis in swine. *Biochem. Physiol.*, **B**, **47**, 263, 1974.
9. Nowak J.: Wpływ żywienia i warunków ekologicznych na zachowanie się niektórych związków tłuszczowych w surowicy krwi świń oraz na występowanie zmian arteriosklerotycznych w aorcie. *Dysertacja doktorska*, WSR Lublin, 1969.
10. Persson R., Gentz J. C. H., Hakkarainen J., Kellum M.: Catecholamine induced lipolysis and its relation to oxygen consumption in the new-born pig. *Pediat. Res.*, **5**, 435, 1971.
11. Rubaj B.: Badania histochemiczne glikogenu w wątrobie małych importowanych w pierwszym okresie aklimatyzacji. *Annales UMCS, sect. DD*, **21**, 60, 1966.
12. Walawski J.: Prolegomena stresu. *Acta Physiol. Polon. Suppl.*, **10**, 85, 1975.
13. Wenke M.: Effects of catecholamines on lipid mobilisation. *Adv. Lipid Res.*, **4**, 69, 1966.
14. Żarów W.: Ocena równowagi lipemicznej u świń w stresie okołoubojowym i po zastosowaniu relanimalu. *Dysertacja doktorska*, AR, Lublin 1977.

Wpł. 18 VII 1977 r.

РЕЗЮМЕ

Опыты велись на случайно избранных 14 свиньях—самках крупной белой польской породы весом около 100 кг. Для исследований брали кровь из хвостатых вен в 3 последовательных этапах: а) в откормочнике — 2 часа до транспорта; б) в хранилище, после транспорта; в) после 24 часов голодания в убойном зале и сразу же после убоя. В сыворотке крови определено тотальный, свободный и эфирный холестерин, тотальные жиры, свободные жирные кислоты, фосфолипиды, О фракцию, пребету, бета и альфа-липопротеиды. Липиды сыворотки разделены дополнительно методом тонкослойной хроматографии на пластинках ДС Fertigplatte Kieselgel Marcka, применяя в обоих случаях методы предыдущих исследований.

Обнаружено выразительное влияние стрессов транспортного и психологического типа на уровень исследованных липидов крови. Линейный рост замечено в случае тотального холестерина (этап 1, 2, 3) 124,3—127,8—144,1 мг/100 мл сыворотки, свободного холестерина: 31,0—33,0—38,3 мг/100 мл, свободных жирных кислот: 325—360—425 мг/л, тотальных жиров: 398—422—483 мг/100 мл. Уровень фосфолипидов, так как и уровень эфирного холестерина проявлял относительное постоянство. Значительное перемещение отмечено во фракции пре и бета-липопротеидовых оценках вместе с процентом: 36,2—37,4—41,4%. Рост

представленных липидов был статистический. Выступала положительная корреляция между силой действующего стрессообразующего источника (стрессора), особенно во время убоя и высотой уровня липидов в крови. Перемещение в составе исследованных липидов было результатом умеренной гиперлипидемии. Изменения выступали быстро и удерживались на соответствующем уровне. Считается, что определение уровня липидов сыворотки крови во время стресса может быть ориентировочным тестом при характеристике величины реакции организма свиней.

SUMMARY

A group of 14 sows, taken at random, WPB, weight about 100 kg was investigated in 3 successive stages. In blood serum taken from the *vena caudalis*, total cholesterol (CT), free (CF), estrified (CE), total fat (TF) free fatty acids (FFA), phospholipide (PhL) and lipoprotein fractions (LPf) — chylomicrons, prebeta (VLDL), beta (LDL) and alfa (HDL), were investigated: a) on the farm, 2 hours before transportation, b) in a slaughter house, c) 24 hours after fasting in a slaughter house hall immediately after slaughter. Serum lipids were divided with the help of thin layer chromatography on silica gel plaques of Merck, according to the previous methods.

A clear effect of transportation and psychogenic stressors was seen on the level of the investigated blood lipids. Linear increase of CT was found (stages a, b, c) — 124.3—127.8—144.1 mg/100 ml serum, CF — 31.0—33.0—38.3 mg/100 ml, FFA — 325—360—425 mval/l, TF — 398—422—483 mg/100 ml. The level of phospholipides, similar to that if CE was relatively stable. In pre- and beta fractions of lipoproteids taken totally deviations were considerable, 36.2—37.4—41.4%. The increase of these lipids was a positive correlation between the strength of the stressor, especially at slaughter and the level of blood lipids. Deviations in the lipids compounds pointed to moderate hyperlipidemy. It occurred fast and remained on the appropriate level. It is suggested that the evaluation of serum lipids in stress can be as a test of information for the characteristics of the reaction extent in swine organism.