

KONCENTRACIJA ADRENALINA U SERUMU DIVLJE SVINJE (*Sus scrofa L.*) NAKON PONOVLJENOG SMRZAVANJA, ODREĐENA ELISA METODOM

Neška Vukšić, T. Florijančić, I. Bošković, M. Đidara, Mirela Pavić, Marcela Šperanda

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

Prva reakcija životinja na stres je izlučivanje adrenalina, hormona srži nadbubrežne žlijezde, koji ima jak metabolički učinak. Uzorci krvi divljih svinja uzeti su od 42 zdrave životinje, nakon lova prigonom i odmah nakon odstrjela. Životinje, čije su tjelesne mase bile između 20 i 95 kilograma, podijeljene su u dvije skupine, do 55 kg (A) i od 60 do 95 kg (B). Koncentracija adrenalina određena je u serumu tjedan dana nakon uzimanja uzoraka i 30 dana nakon ponovnoga smrzavanja na -80°C, metodom ELISA. Mjerenja su izvršena na 450 nm valne duljine na ELISA čitaču. Utvrđena je povišena vrijednost adrenalina u odnosu na referentne vrijednosti u domaćih svinja i ljudi (109,45 pg/ml u skupini A i 119,54 pg/ml u skupini B). Nakon ponovljenoga smrzavanja utvrđene su 12% niže koncentracije adrenalina u A skupini, a 11,17% niže u B skupini, ali bez statističke značajnosti ($P > 0,05$). Biokemijskom pretragom utvrđena je povišena koncentracija glukoze i triglicerida u odnosu na referentne vrijednosti, dok su ostali promatrani pokazatelji bili unutar referentnih vrijednosti. Nije utvrđena povezanost koncentracije adrenalina i glukoze.

Ključne riječi: akutni stres, adrenalin, ELISA, divlja svinja, metaboliti

UVOD

Stres je stanje u kojemu organizam reagira na vanjske ili unutarnje podražaje (stresore), usmjeravajući pritom energiju na suočavanje s opasnim ili ekstremnim situacijama. To je biološki odgovor organizma usmjeren održavanju homeostaze. Odgovarajući odgovor na stresore od ključne je važnosti za dobrobit životinja (Charmandari i sur., 2005.). Prva reakcija tijela na stres je otpuštanje adrenalina, hormona srži nadbubrežne žlijezde. On pojačava glikogenolizu u jetri i mišićima, mobilizaciju slobodnih masnih kiselina i povećava koncentraciju laktata u plazmi. Uzrokuje ubrzano disanje, širenje zjenica i dišnih putova, povećava opskrbu mišića kisikom i hranjivim tvarima, služi za održavanje drugih tjelesnih sustava (Ganong, 2010.).

Adrenalin je antagonist svih adrenergičnih receptora, uključujući glavne podtipove $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$ (Shen, 2008.). Vežući se za α -adrenergične receptore, inhibira lučenje inzulina, stimulira glikogenolizu u jetri i mišićima te potiče glikolizu u mišićima. Vezanjem za β -adrenergične receptore, aktivira izlučivanje glukagona

u gušterači, povećava izlučivanje adrenokortikotropnoga hormona (ACTH) i povećava lipolizu u masnom tkivu. Zajedno, ti učinci dovode do povećane razine glukoze u krvi i masnih kiselina (Sabyasachi, 2007.). Adrenalin djeluje preko β -adrenergičnih receptora, povećava količinu cikličkog adenozin monofosfata (cAMP), aktivira fosforilazu i putem α -adrenergičnih receptora povećava intracelularnu koncentraciju kalcija. Jedna od stresnih situacija je lov, pri kojemu se aktivira niz kemijskih reakcija koje dovode do aktivacije simpatičkoga sustava, zbog čega dolazi do otpuštanja hormona adrenalina.

Dobra metoda za određivanje koncentracije adrenalina u serumu je ELISA metoda (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) ili imunoenzimski test.

Ciljevi rada bili su (1) utvrditi postojanost rezultata određivanja koncentracije adrenalina nakon zamrzavanja

Neška Vukšić, mag.ing.agr., prof.dr.sc. Tihomir Florijančić, doc.dr.sc. Ivica Bošković, dr.sc. Mislav Đidara, Mirela Pavić, dr.med.vet., prof.dr.sc. Marcela Šperanda (marcela.speranda@pfos.hr) – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, 31000 Osijek

i čuvanja uzoraka mjesec dana na -80°C ; (2) odrediti neke biokemijske pokazatelje u serumu divljih svinja.

MATERIJAL I METODE

Uzorci krvi divljih svinja (*Sus scrofa L.*) prikupljeni su tijekom sezone lova prigonom. Istraživanje je provedeno u državnom otvorenom lovištu br. XIV/23 "KRNDIJA II", površine 6850 ha. Uzorci krvi 42 divlje svinje obaju spolova, tjelesne mase od 20 do 95 kilograma, uzeti su iz srca, odmah nakon odstrela u vakuum epruvete za serum. Životinje su vagane nakon odstrjela i podijeljene u dvije skupine: do 55 kg (A) i od 60 do 95 kg (B). Krv je centrifugirana 10 minuta na 3000 okretaja, odvojeni su serumi i pohranjeni u hladnjak na -80°C do analize. Prve analize odrađene su tjedan dana nakon uzorkovanja, a ponovljeno mjerenje istih uzoraka 30 dana nakon ponovnoga zamrzavanja i čuvanja na -80°C . Koncentracija adrenalina u uzorcima seruma određena je pomoću komercijalno dostupnoga Porcine Epinephrine/Adrenaline (EPI) ELISA Kit-a (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Shanghai, Kina), prema uputama proizvođača. Uzorci su kvantificirani u dva testa, s prosječnim koeficijentom varijacije za intra-test $<10\%$ i koeficijentom varijacije za inter-test $<12\%$. Mjerenja su izvršena na 450 nm valne duljine na ELISA čitaču (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Biorad, Engleska). U krvnome serumu određena je koncentracija metabolita (glukoza, urea, kreatinin, ukupni proteini, albumini, trigliceridi) automatskim multikanalnim biokemijskim analizatorom Beckman Coulter AU 400 (Beckman Coulter, Germany), koristeći komercijalne reagense Beckman Coulter. Podaci su obrađeni pomoću statističkoga programa SAS (verzija 8.02 za Windows). Razlike među dobnim kategorijama određene su GLM testom za ponovljena mjerenja, a značajnost je utvrđena Fisherovim (LSD) *post hoc* testom.

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultate koncentracija adrenalina u serumu divljih svinja, podijeljenih prema tjelesnoj masi, prikazuje Tablica 1. Starije životinje imale su numerički veću prosječnu koncentraciju adrenalina nakon izloženosti stresu u odnosu na mlađe, a dobivene vrijednosti su u užim granicama. Koncentracija adrenalina u čovjeka kreće se u rasponu između 47 i 71 pg/ml (Buhler i sur., 1978.), a u domaće svinje 20–132 pg/ml u normalnim uvjetima bez stresa (Hannon i sur., 1989.). U našem slučaju, prema dostupnim podacima, starije svinje (procijenjeno prema tjelesnoj masi; skupina B) imala je veću koncentraciju adrenalina. Iako su srednje vrijednosti obaju skupina bile podjednake i bez značajnih razlika, vidljiva je veća minimalna vrijednost u skupini B u odnosu na skupinu A, dok su maksimalne vrijednosti ponovno podjednake. Iskustvo, očito, nije utjecalo na smanjenje stresa u odraslih životinja, upravo suprotno. Buhler i sur. (1978.) navode povećanja adrenalina 28 puta, noradrenalina 5,5 puta, dopamina 3 puta nakon petominutne izloženosti stresu, koje su se održale tije-

kom 60 minuta. Oslobođanje katekolamina javlja se vrlo brzo nakon izloženosti kratkoročnome stresu (Dalin i sur., 1993.), kao i stresu zbog transporta (Roozen i sur., 1995.). Vrlo je teško procijeniti utjecaj vrste stresa na dobrobit životinje u cjelini, posebno u dugotrajnim stresnim situacijama. Otkucaji srca, krvni tlak i ponašanje također mogu koristiti za procjenu odgovora na stres, međutim procjena tih odgovora zahtijeva detaljno poznavanje normalnih fizioloških funkcija i ponašanja, jer je odgovor na stres pod utjecajem nekoliko čimbenika, kao što su metaboličko stanje, zdravstveni status, dob, spol i zrelost životinje (Einarsson i sur., 2008.). Ponovno izlaganje istom stresoru može uzrokovati čak i navikavanje sustava hipotalamus-hipofiza-nuzbubrežna žlijezda na stres (Pitman i sur., 1988.). Prema dobivenim koncentracijama adrenalina u serumu divljih svinja, vidljivo je da su životinje tijekom lova prigonom bile izložene stresu, što je dovelo do povećanja razine adrenalina u krvi, jače u starijih životinja. Prema Ganongu (2010.), stimulacija nekih dijelova hipotalamusa može prouzročiti srčane aritmije, koje se javljaju zbog istovremenog aktiviranja vagusnih i simpatičkih živčanih vlakana, koji inerviraju srce. Izlučivanja jednoga ili drugoga katekolamina javljaju se u određenim situacijama. Djelovanja hormona štitaste žlijezde i katekolamina (adrenalina i noradrenalina), usko su povezani. Adrenalin ubrzava metabolizam, stimulira živčani sustav i djeluje na kardiovaskularni sustav, poput hormona štitaste žlijezde, iako je trajanje tih reakcija vrlo kratko.

Tablica 1. Koncentracija adrenalina u serumu divljih svinja (pg/ml)

Table 1. Statistical data epinephrine concentrations in blood serum of wild boar (pg/ml)

Skupina	SV	SD	KV (%)	Min – max
A (n=24)	109,45	30,51	27,87	37,21 – 158,48
B (n=18)	119,54 ^{n.z.}	28,52	23,86	71,66 – 167,05

SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; KV – koeficijent varijabilnosti; A- živ. tj. mase 20-55 kg; B- živ. tj. mase 60-95 kg; ^{n.z.} nije značajno

Ponovljenim određivanjem adrenalina u serumu nakon zamrzavanja i čuvanja u hladnjaku, utvrđene su niže vrijednosti adrenalina (Tablica 2.) u odnosu na prvo mjerenje. Smanjenje je bilo veće u skupini A (12%), u odnosu na skupinu B (11,17%), ali bez statistički značajnih razlika.

Tablica 2. Koncentracija adrenalina u serumu krvi divljih svinja nakon ponovljenoga smrzavanja (pg/ml)

Table 2. Statistical data epinephrine concentrations in blood serum of boars after repeated freezing (pg/ml)

Skupina	SV	SD	KV(%)	Min – max
A (n=24)	96,71	24,18	25,01	26,73 – 137,63
B (n=18)	96,63 ^{n.z.}	24,26	24,10	62,71 – 139,00

SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; KV – koeficijent varijabilnosti; A- živ. tj. mase 20-55 kg; B- živ. tj. mase 60-95 kg; ^{n.z.} nije značajno

Koncentracije kortizola, adrenalina, noradrenalina i dopamina u svinja mogu se iskoristiti za praćenje funkcije nadbubrežne žlijezde i korisne su u istraživanju efekta stresa nakon izlaganju stresoru od samo pet minuta (Rosochacki i sur., 1999.).

Istraživanjem smo životinjama odredili vrijednosti nekih biokemijskih pokazatelja, kao kontrolu izlučivanja adrenalina (Tablice 3. i 4.). Utvrđena prosječna koncentracija glukoze od 10,44 mmol/L u mlađih životinja i 11,00 mmol/L u starijih životinja znatno je viša od vrijednosti za domaće svinje, koje su utvrdili Radostis i sur. (2000.), ali je u skladu s dobivenim vrijednostima veprova za rasplod (Harapin i sur., 2003.). Barasona i sur. (2013.) utvrdili su niže vrijednosti glukoze u serumu divlje svinje od naših. Koncentracija je u njihovome

slučaju ovisila o vrsti zamke za hvatanje. Hvatanje pomoću kaveza manje je povisilo koncentraciju glukoze u krvi (8,64 mmol/L), dok je hvatanje u koralu rezultiralo većom koncentracijom glukoze (9,92 mmol/L). Isti autori utvrdili su statistički značajnu negativnu povezanost načina hvatanja svinja i koncentracije glukoze, što se može dovesti u vezu sa stresnim trenutkom hvatanja i sputavanja. Utvrđena je blago povišena koncentracija triglicerida i ureje u mlađih životinja, što je pod utjecajem mnoštvenih čimbenika (dob, spol, sezona, hranidba, stres). Koncentracija ukupnih proteina, kreatinina i albumina u granicama su fizioloških vrijednosti (Swenson i sur., 1984.; Kaneko i sur., 1997.; Harapin i sur., 2003.).

Tablica 3. Neki biokemijski pokazatelji u serumu divljih svinja tjelesne mase do 55 kg

Table 3. Some biochemical parameters in the serum of wild boar (up to 55 kg)

Pokazatelji - Indicators (n = 24)	SV	SD	KV (%)	Min - max
Glukoza (mmol/L)	10,44	7,48	71,64	2,37 – 34,64
Urea (mmol/L)	8,16	3,25	39,77	2,55 – 14,22
Kreatinin (μ mol/L)	147,56	31,01	21,02	102,80 – 226,20
Ukupni proteini (g/L)	76,51	6,74	8,81	62,20 – 87,80
Albumini (g/L)	35,04	4,23	12,07	24,90 – 42,30
Trigliceridi (mmol/L)	2,08	0,79	37,38	0,90 – 3,48

SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; KV – koeficijent varijabilnosti

Koncentracije ureje, kreatinina, ukupnih proteina i albumina starijih životinja (Tablica 4.) u granicama su fizioloških vrijednosti (Swenson i sur., 1984.; Kaneko i

sur., 1997.; Harapin i sur., 2003.), dok je glukoza s prosječnom vrijednosti 11,00 mmol/L značajno povišena. Utvrđeno je i blago povećanje koncentracije triglicerida.

Tablica 4. Neki biokemijski pokazatelji u serumu divljih svinja tjelesne mase do 95 kg

Table 4. Some biochemical parameters in the serum of wild boar (up to 95 kg)

Pokazatelji - Indicators (n = 18)	SV	SD	KV (%)	Min - max
Glukoza (mmol/L)	11,00	10,53	95,72	5,20 – 47,68
Urea (mmol/L)	6,92	2,60	37,59	3,01 – 13,56
Kreatinin (μ mol/L)	168,97	26,54	15,71	107,60 – 217,20
Ukupni proteini (g/L)	79,50	6,93	8,72	66,50 – 93,40
Albumini (g/L)	41,40	4,50	10,86	33,70 – 48,20
Trigliceridi (mmol/L)	2,08	0,74	35,74	1,04 – 3,58

SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; KV – koeficijent varijabilnosti

ZAKLJUČAK

Uvažavajući minimalne i maksimalne vrijednosti koncentracija adrenalina, utvrđene su veće vrijednosti u serumu divljih svinja veće tjelesne mase (60-95 kg) u odnosu na životinje do 50 kg tjelesne mase, što znači da iskustvo nije smanjilo reakciju na stres. Ponovljenim

smrzavanjem seruma i analizom nakon mjesec dana, utvrđene su niže koncentracije adrenalina u serumu, ali bez statističke značajnosti. Utvrđena je povišena koncentracija glukoze i triglicerida u obje skupine životinja. Nije utvrđena povezanost koncentracija adrenalina i glukoze (podatci nisu prikazani).

LITERATURA

1. Barasona J.A., López-Olvera J.R., Beltrán-Beck B., Gortázar C., Vicente J. (2013): Trap-effectiveness and response to tiletamine-zolazepam and medetomidine anaesthesia in Eurasian wild boar captured with cage and corral traps. *Vet. Res.* 9:107.
2. Buhler, H.U., Prada, M., Haefely, W., Picotti, G.B. (1978): Plasma adrenaline, noradrenaline and dopamine in man and different animal species. *J. Phys.* 276: 311-320.
3. Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G. (2005): Endocrinology of the stress response. *Ann Rev of Physiol*, 67: 259-284.
4. Dalin, A.M., Magnusson, U., Häggendal, J., Nyberg, L. (1993): The effect of transport stress on plasma levels of catecholamines, cortisol, corticosteroid-binding globulin, blood cell count, and lymphocyte proliferation in pigs. *Acta Vet. Scand.*, 34: 59-68.
5. Einarsson, S., Brandt, Y., Lundeheim, N., Madej, A. (2008): Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Vet. Scand.*, 50: 48.
6. Ganong, W.F. (2010): Review of Medical Physiology, nineteenth edition, Medical Publishing Division.
7. Hannon, J.P., Bossone, C.A., Wade, C.E. (1989): Normal physiological values for conscious pigs used in biochemical research, Letterman army institute of research presidio of San Francisco California. Institute Report No. 379.
8. Harapin, I., Bedrica, Lj., Hahn, V., Šoštarić, B., Gračner, D. (2003): Haematological and biochemical values in blood of wild boar (*Sus scrofa ferus*), *Vet. Arh.* 73(6): 333-343.
9. Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (1997): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed., Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.
10. Pitman, D.L., Ottenweller, J.E., Natelsen, B.H. (1988): Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: Chronic stress and habituation, *Physiol. Behav.* 43: 47-55.
11. Radostis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. (2000): *Veterinary Medicine*, 9th ed., W. B. Saunders Company Ltd., London, New York, Philadelphia, San Francisco, St. Louis, Sydney.
12. Roozen, A.W.M., Tsuma, V.T., Magnusson, U. (1995): Effects of short-term stress on plasma concentrations of catecholamines, β -endorphin, and cortisol in gilts. *Am J. Vet. Res.* 56 (9): 1225 – 1227.
13. Rosochacki, S.J., Piekarczywska, A.B., Poloszynowicz, J., Sakowski, T. (1999): The Influence of Restraint Immobilization Stress on the concentration of Bioamines and Cortisol in Plasma of Pietrain and Duroc Pigs, Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Science, Poland. *J. Vet. Med.* 47: 231–242.
14. Sabyasachi, S. (2007). *Medical Physiology*. Thieme Publishing Group. p. 536. ISBN 3-13-144061-9.
15. Shen, H. (2008): *Illustrated Pharmacology Memory Cards: PharMnemonics*. Minireview. p. 4. ISBN 1-59541-101-1.
16. Swenson, M. J. (1984.): Fiziološke osobine stanica i kemijski sastav krvi. U: *Djuksova fiziologija domaćih životinja*. Svjetlost, Sarajevo, 21.–64.

EPINEPHRINE CONCENTRATION IN WILD BOAR (*Sus scrofa* L.) SERUM AFTER REPEATED ELISA TESTED FREEZE-THAWING CYCLES

SUMMARY

Blood samples for determining of epinephrine concentration and biochemical parameters in the blood serum of wild boars were taken from 42 healthy wild boars, both sexes, during the hunting season. All animals in good condition, body weight 20 to 95 kg, were divided into two groups up to 50 kg (group A) and up to 95 kg (Group B). Epinephrine concentration was determined by ELISA twice: one week after taking samples and a month after repeated freezing at -80°C. It was higher in relation to the reference value of domestic pigs and human (109.45 pg/ml in A and 119.54 pg/ml in B group). Repeated freezing and re-analysis after a month were resulted in lower concentrations of epinephrine (12% in young and 11.17% in adult animal), but without statistical significance ($P > 0.05$). Biochemical analysis results show increased glucose and triglycerides concentrations compared to the reference values, while other indicators were observed within or slightly increased referring to the normal range. The correlation between glucose and epinephrine was not determined.

Key-words: acute stress, epinephrine, ELISA, wild pigs, metabolites

(Primljeno 30. listopada 2013.; prihvaćeno 22. studenoga 2013. - Received on 30 October 2013; accepted on 22 November 2013)