

ANDMEID KÜLMUTAMISE MÕJUST VEISTE VERESEERUMI ÜLDKOLESTEROOI, TRIGLÜTSEERIIDIDE JA VABADE RASVHAPETE SISALDUSELE

H. Jaakson, K. Ling

Sissejuhatus

Metaboliitide kontsentratsioonid veres hoitakse *in vivo* suhteliselt konstantsetena. Varieeruvused teatud piirides on normaalsed ja seotud organismi füsioloogilist seisundit mõjutavate teguritega nagu sugu, vanus, tiinus, ajalis-sesoonsed rütmid, laktatsioon, söötmine jpt. faktorid. Kõrvalekalded standardpiiridest viitavad patoloogiale. Vere metaboliitidesisalduse alusel on seega võimalik hinnata organismi seisundit ja panna diagnoosi.

Vereproovis vallanduvad kohe pärast proovi võtmist füüsikalised-keemilised, biokeemilised ning mikrobioloogilised protsessid, millega kaasnevad metaboliitide kontsentratsioonide muutused. Muutuste ulatus sõltub vereproovi esmasest töötlemisest, ajavahemikust, mis kulub proovivõtust töötlemise ja/või analüüsini, ning tingimustest, mille juures töötlemata või töödeldud vereproovi kuni analüüsini säilitatakse. Et saada tõepäraseid tulemusi, tuleks vereproov töödelda, st. eraldada plasma või seerum, ja analüüsida võimalikult kiiresti pärast proovi võtmist. Praktikas on see enamasti võimatu (välitingimustes puudub vastav aparatuur), vahel ka ebaotstarbekas (väikese arvu proovide analüüs on suhteliselt töömahukam ja kulukam). Seetõttu rakendatakse praktikas proovide külmutamist enne nende analüüsi.

Käesolevas töös on vaatluse all külmutamise mõju üldkolesterooli, triglütseriidide ja vabade (esterifitseerumata) rasvhapete (edaspidi: NEFA) sisaldusele vereseerumis.

Andmed nimetatud metaboliitide säilivuse kohta on erinevais kirjandusallikais küllaltki erinevad ja tihti vastuolulised. Nii püsib Siedeli jt. (1985) andmeil seerumi üldkolesterooli kontsentratsioon stabiilsena 6 päeva 2–25 °C juures. B. Draegeri jt. (1985) väitel muutub seerumi HDL-kolesterooli (HDL: *high density lipoprotein* – kõrge tihedusega lipoproteiin; HDL-kolesterool – kõrge tihedusega lipoproteiiniga seotud kolesterool) sisaldus –70 °C juures mõne kuu jooksul vaid tühisel määral. Autorid märgivad HDL-kolesterooli sisalduse muutuse ühe põhjusena võimalikku seostumist seerumi erinevate lipoproteiinidega. L. Kerschert jt. (1985) viitavad LDL-kolesterooli (LDL: *low density lipoprotein* – madala tihedusega lipoproteiin; LDL-kolesterool – madala tihedusega lipoproteiiniga seotud kolesterool) vähesele stabiilsusele – 1 päev 4–10 °C juures – ning ei pea võimalikuks proovi külmutamist. M. Schmidt (1979) järgi säilib üldkolesterooli sisaldus konstantsena 6 kuud –20 °C juures.

Seerumi triglütseriidide kontsentratsioon püsib kirjanduse andmetel 4 °C juures stabiilsena 3 päeva (Schmidt, 1979; Nägele jt., 1985), –20 °C juures mõned nädalad (Schmidt, 1979). Autorid ei too kahjuks välja võimalikke kontsentratsioonimuutuste põhjusi. Oletada võib glükolüüsi ja teiste metaboolsete protsesside *in vitro* jätkumist ning keemilist lagunemist.

NEFA sisalduse täpseks määramiseks soovivad S. Shimizu ja H. Yamada (1985) teha analüüs proovivõtu päeval või säilitada seerum –20 °C juures. Kahjuks ei märgi autorid, kui pikk oli säilitusperiood ja milline NEFA sisalduse muutus nende katses. Samas viitavad S. Shimizu (1983, ref. Roche Diagnostics GmbH, 1999) ja R. Harris (1974, ref. sealsamas) NEFA sisalduse veidi suuremale püsivusele: 4 °C juures 7 päeva, 20–25 °C juures 2 päeva.

Materjal ja meetodika

Käesoleva töö katsematerjal koguti 1999.–2000. a. kolmest farmist. Vereproovid võeti erinevates laktatsioonistaadiumides olevatelt eesti holsteini tõugu lüpsilehmadelt sabaveenist 3–6 tundi pärast söötmist. Verest eraldati seerum, mis jagati kahte ossa. Ühes osas määrati üldkolesterooli, triglütseriidide ja vabade rasvhapete sisaldused enne, teises osas pärast külmutamist ja säilitamist –20 °C juures 1–2 nädala vältel. Katses kasutatud proovide arv oli 29, millest üldkolesterool määrati kõigis, triglütseriidid 26 ja NEFA 23 proovis. Kontsentratsioonid seerumis määrati kolorimeetriselt: üldkolesterool ja triglütseriidid firma HUMAN komplektidega (mõlemal juhul nn. ensümaatilise-kolorimeetriselise *end-point* (lõpp-punkti) meetod), vabad rasvhapped modifitseeritud Liunggereni-Perasoni (ref. Lutski jt., 1978; Kondrahini jt., 1985) meetodil. Iga metaboliidi kohta arvatati proovide keskmised enne ja pärast külmutamist ning kontsentratsiooni muutus

protsentides (tabel 1). Muutuse statistiliseks hindamiseks leiti *MS Excel*'i statistikaprogrammi abil regressioonistatistikud: determinatsioonikordajad ja jääkstandardhälbed (vastavalt r^2 ja s , tabel 1).

Tulemused ja arutelu

Katsetulemused on esitatud tabelis 1. Vaatlusaluste metaboliitide kontsentratsioonide individuaalväärtused nagu ka arvatud keskväärtused mahtusid I. Kondrahhini jt. (1985) ning D. Lutski jt. (1978) poolt toodud füsioloogilise normi piiridesse. J. Kaneko jt. (1997) arvates on üldkolesterooli ja triglütseriidide normväärtused siiski madalamad. Mõnede autorite väitel võib seerumi üldkolesterooli sisaldus olla ka märgatavalt suurem (Ruegg jt., 1992; Jagdale jt., 1995). Metaboliitide kontsentratsioonide suhteliselt suure individuaalse varieeruvuse üheks põhjuseks võis olla asjaolu, et doonorloomad olid erinevates laktatsioonistaadiumides. Sõltuvusele laktatsioonistaadiumist viitavad mitmete autorite andmed (Ruegg jt., 1992; Jagdale jt., 1995; Grum jt., 1996; Rukkamsuk jt., 1998; Jaakson, Ling, 2000).

Külmutamine mõjus proovide üldkolesterooli ja triglütseriidide sisaldust vähendavalt: kontsentratsioonide langused seerumis olid vastavalt 10% ja ligikaudu 20%. NEFA kontsentratsioon seerumis külmutamise tagajärjel, vastupidiselt, tõusis 4% võrra. Leitud regressioonistatistikute põhjal oli üldkolesterooli sisalduse mainitud langus kehtiv keskmiselt umbes 80% tõenäosusega ja prognoositav ligikaudu 14 mg% täpsusega ($r^2=0,81$, $s=14,4$, tabel 1). Triglütseriidide puhul olid vastavad näitajad ligikaudu 40% ja umbes 7 mg% ($r^2=0,37$, $s=7,4$, tabel 1) ning NEFA puhul ligikaudu 40% ja ligikaudu 60 $\mu\text{mol/l}$ ($r^2=0,36$, $s=62,3$, tabel 1). Üldkolesterooli ja triglütseriidide korral kirjeldas leitud regressioonimudel kontsentratsioonide langust olulisuse nivool 0,001 ning NEFA korral olulisuse nivool 0,05 (p , tabel 1). Suhteliselt väike korreleeruvus algsete ja külmutamisjärgsete määramiste vahel oli triglütseriidide ja NEFA puhul tingitud ilmselt kasutatud analüüsimeetodite ebatäpsusest ja vähesest tundlikkusest.

Tabel 1. Sügavkülmutamise mõju üldkolesterooli, triglütseriidide ja NEFA kontsentratsioonile vereseerumis
Table 1. Influence of freezing on total cholesterol, triglycerides and NEFA concentrations in serum

Parameeter <i>Parameter</i>	Üldkolesterool <i>Total Cholesterol</i>	Triglütseriidid <i>Triglycerides</i>	Vabad rasvhapped <i>NEFA</i>
n	29	26	23
Algkontsentratsioon <i>Initial concentration</i>	156 (75–212)*	38 (24–58)*	190 (97–382)**
Külmut.-järgne konts. <i>Conc. after freezing</i>	140 (80–174)*	31 (22–68)*	197 (118–400)**
Konts. muutus <i>Conc. change %</i>	–10,0	–19,6	+3,5
r^2	0,81	0,37	0,36
s	14,4	7,4	62,3
p	<0,001	<0,001	<0,05

* – kontsentratsioon mg%

** – kontsentratsioon $\mu\text{mol/l}$

NEFA – *non-esterified fatty acids*

Saadud andmete põhjal võib teha järgmisi esialgseid järeldusi: seerumi üldkolesterooli ja triglütseriidide sisaldus sügavkülmutatult säilitatuna langeb, NEFA sisaldus tõuseb.

On selge, et estersidemete ensümaatiline ja/või spontaanne hüdrolyüs põhjustab seerumi NEFA sisalduse tõusu, NEFA esterifitseerumine ja seostumine seerumi erinevate lipiidsete komponentidega jällegi sisalduse vähenemist. S. Shimizu ja H. Yamada (1985) märgivad NEFA ebastabiilsuse põhjustena just nimetatud protsesse. NEFA sisalduse suurenemine katses oli ilmselt tingitud “täiendava” koguse vabade rasvhapete lisandumisest seerumi lipoproteiinide ja triglütseriidide arvel. Tõenäoliselt prevaleerivad $-20\text{ }^\circ\text{C}$ juures hüdrolyüsiprotsessid esterifitseerumisprotsesside ees. Üldkolesterooli ja triglütseriidide kontsentratsioonide vähenemine oli arvatavasti põhjustatud nende spontaanselt keemilisest lagunemisest ja/või aeglasest *in vitro* metaboliseerumisest. Ilmselt pole temperatuur $-20\text{ }^\circ\text{C}$ siiski piisavalt madal, surumaks alla biomolekulidega toimuvaid muutusi. Tundub loogilisena, et külmutamine kui mõjufaktor iseenesest ei toimi uuritud metaboliitide

kontsentratsioonid muutvalt. Pigem aeglustuvad protsessid, mis kõrgemal temperatuuril toimuksid veelgi intensiivsemalt.

Edaspidises uurimistöös tuleb kindlaks teha, kuidas muutuvad vaatlusaluste metaboliitide kontsentratsioonid pikemaajalisel külmutamisel ja kas kontsentratsioonimuutused on kirjeldatavad mingi matemaatilise seose kaudu. Juhul kui selline seos eksisteerib, saab seda kasutada metaboliitide kontsentratsioonide algväärtuste prognoosimiseks külmutamisjärgsete näitajate põhjal. See võiks olla abiks kõigile, kelle töö on seotud kliinilise biokeemiaga ja kellel esineb vajadus proovimaterjali säilitada.

Kirjandus

- Draeger, B., Wahlefeld, A., Ziegenhorn, J. HDL-Cholesterol. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Editor-in-Chief: Bergmeyer, H. U., Weinheim; Deerfield Beach, FL: VCH. Vol. 8. Metabolites, p. 148...154, 1985.
- Grum, D. E., Drackley, J. K., Youncer, R. S., LaCount, D. W., Veenhuizen, J. J. Nutrition During Dry Period and Hepatic Lipid Metabolism of Periparturient Dairy Cows. – *Journal of Dairy Science*, 79, 1996, p. 1850...1864.
- Jaakson, H., Ling, K. Vabade rasvhapete sisaldusest eesti holsteini tõugu lüpsilehmade vereseerumis poegimiseelsel ja -järgsel perioodil. – *Akadeemilise Põllumajanduse Seltsi toimetised* 12, lk. 15...18, 2000.
- Jagdale, D. S., Talvelkar, B. A., Mantri, A. M., Deshmukh, B. T. Studies in Lipid Profile in Crossbreed Cows. – *Indian Journal of Dairy Science*, 48, 1, p. 89...91, 1995.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, 1997. – 932 p.
- Kerschler, L., Draeger, B., Maier, J., Ziegenhorn, J. LDL-Cholesterol. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Editor-in-Chief: Bergmeyer, H. U. Weinheim; Deerfield Beach, FL: VCH. Vol. 8. Metabolites, p. 154...160. 1985.
- Kondrahhin, I. P., Kurilov, N. V., Malahhov, A. G., Arhipov, A. V., Belov, A. D., Beljakov, I. M., Blinov, N. I., Korobov, A. V., Frolova, L. A., Sevastjanova, N. A. *Laboratoorne kliiniline diagnoosivõime veterinaarias*. Agropromizdat, Moskva, 1985. – 289 lk. (vene keeles).
- Lutski, D. J., Sarov, A. V., Siskov, V. P., Selenskaja, Z. M., Samohhin, V. T., Kondrahhin, I. P. Kõrgetoodanguliste lehmade ainevahetushaigused. Kirjastus "Kolos", Moskva, 1978. – 384 lk. (vene keeles).
- Nägele, U., Wahlefeld, A., Ziegenhorn, J. Triglycerides. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Editor-in-Chief: Bergmeyer, H. U. Weinheim; Deerfield Beach, FL: VCH. Vol. 8. Metabolites, p. 3...18. 1985.
- Roche Diagnostics GmbH. Free Fatty Acids, Half – micro Test. Optimized Enzymatic Colorimetric Assay for the Determination of Free Fatty Acids in Research Samples from Serum or Plasma. *Metoodiline juhend seerumi või plasma NEFA sisalduse määramiseks Roche Diagnostics GmbH komplekti abil*, 1999.
- Ruegg, P. L., Goodger, W. J., Holmberg, C. A., Weaver, L. D., Huffman, E. M. Relation Among Bod Condition Score, Milk Production, and Serum Urea Nitrogen and Cholesterol Concentrations in High-producing Holstein Dairy Cows in Early Lactation. – *American Journal of Veterinary Research*, 53, 1, p. 5...9, 1992.
- Rukkwamsuk, T., Wensing, T., Geelen, M. J. H. Effect of Overfeeding During the Dry Period on Regulation of Adipose Tissue Metabolism in Dairy Cows During the Periparturient Period. – *Journal of Dairy Science*, 81, p. 2904...2911, 1998.
- Schmidt, M. *Laboratory Testing in Veterinary Medicine. Diagnosis and Clinical Monitoring*. Boehringer Mannheim GmbH. 1979. – 130 p.
- Shimizu, S., Yamada, H. Free Fatty Acids. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Editor-in-Chief: Bergmeyer, H. U. Weinheim; Deerfield Beach, FL: VCH. Vol. 8., p. 19...34, 1985.
- Siedel, J., Rollinger, W., Röschlau, P., Ziegenhorn, J. Total Cholesterol, End-point and Kinetic Method. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Editor-in-Chief: Bergmeyer, H. U., Weinheim; Deerfield Beach, FL: VCH, Vol. 8. Metabolites, p. 139...148, 1985.

Uurimistööd toetas Eesti Teadusfond (grant nr. 3708).

Effect of Freezing on the Serum Cholesterol, Triglycerides and Free Fatty Acids Concentrations in Estonian Holstein Breed Cows

H. Jaakson, K. Ling

Summary

Freezing of blood samples is reasonable or necessary in some occasions. Therefore the objective of the study was to evaluate the effect of freezing on serum cholesterol, triglycerides and non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations in Estonian Holstein Breed cows. Blood samples were divided into two portions. In one of them the concentrations of the metabolites were determined on the day of sampling, the other portion was frozen and analysed in 1–2 weeks. Based on the two sets of analyses the average concentrations of the three metabolites, concentration change in percentages and regression statistics (r^2 and standard error) were calculated. Concerning triglycerides and NEFA the correlation between the concentrations on the day of sampling and after freezing was rather weak (r^2 , Table 1). Cholesterol concentration after freezing was decreased, concentration of triglycerides tended to decrease and free fatty acids concentration to increase (Table 1). All the changes were statistically reliable (significance probabilities: 0.001; 0.001 and 0.05 respectively). More analyses and after different periods of storing at different temperatures are needed in order to get reliable guidelines for practical use in clinical biochemistry laboratory.