С.С. ГРАБОВСЬКИЙ¹, О.С. ГРАБОВСЬКА², А.Я. ВЕЛИКА³

*¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
ім. С.З. Гжицького, e-mail: grbss@ukr.net;*

²Інститут біології тварин НААН, e-mail: alice_grb@inenbiol.com.ua;

*³Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медич-
ний університет", e-mail: velyka.alla@bk.ru*

Біохімічні параметри крові лабораторних тварин за умов передзабійного стресу

Дані літератури про вплив стресової ситуації на поведінку тварин доволі суперечливі, однак більшість авторів схильні вважати, що стратегія поведінки людей і тварин має в основі дві реакції: активну (агресія і втеча) та пасивну (завмирання). Уперше реакції-відповіді на стресові ситуації описав В. Кеннон [5], провівши дослідження на котах. Він зазначив, що в підготовці та здійсненні різних форм поведінки тварини основну роль відіграє функція симпатичної нервової системи і мозкового шару надниркових залоз. У різних біологічних видів переважає одна або інша реакція поведінки [1]. Але жодна з цих форм реакцій на стрес не відповідає стану тварин перед забоєм, коли тварина відчуває не просто небезпеку, а перебуває у безвихідному становищі. На нашу думку, такий стан тварини призводить до змін на метаболічному рівні в усьому організмі значно більшою мірою, ніж за таких форм реакцій як агресія, втеча або завмирання.

Автори досліджень [8, 16], взявши до уваги тривалість транспортування та процес розвантаження тварин, з'ясували, що ці чинники призвели до ушкодження шкіри тварин та впливу на деякі біохімічні показники. Інші дослідники [14, 15] вважали, що одним із аспектів прижиттєвого стресу, який може вплинути на якість м'яса, є випромінювання твариною тепла. Вони провели термографію (дослідження в інфрачервоному діапазоні довжин хвиль) великої рогатої худоби та свиней до і після транспортування і з'ясували, що за активації гіпота-ламо-гіпозарно-надниркової ланки та підвищення рівня катаболічних

процесів, пов'язаних зі стресом перед забоєм, у тварин значно зростає виділення тепла. У наших попередніх дослідженнях [3] на бугайцях української чорно-рябої молочної породи виявлено, що рівень адренкортикотропного гормону (АКТГ) в підготовчий період досліджень був нижчим – на 34 % ($p \leq 0,01$) від вмісту гормону в період до транспортування бугайців на м'ясокомбінат, тобто через п'ять діб від початку досліду. Оскільки кров для біохімічних досліджень брали в один і той же час доби, то можна припустити, що бугайці перед транспортуванням зазнавали значно більшого стресу, ніж під час взяття крові перед дослідом.

Дослідження стресової реакції на лабораторних тваринах проводять переважно в серіях експериментальних моделей стресу – “відкрите поле” [2], “чорно-біла камера” [6], тест “вимушеного плавання” Порсолта [12], тест “підвішування за хвіст” [9], проте мало досліджень щодо змін на метаболічному рівні в організмі тварин у передзабійний період.

Уміст протеїнових фракцій крові є показовим, оскільки має важливе значення для діагностики багатьох захворювань. Альбуміни становлять найбільшу частину білків крові, відіграють важливу роль у підтриманні її онкотичного тиску, у транспортуванні багатьох біологічних речовин: вуглеводів, ліпідів, окремих гормонів, а також мікроелементів (Купрум, Цинк, Магній та ін.) [13]. Тому вміст альбумінів у сироватці крові має діагностичне значення, його зниження свідчить про дисфункцію печінки, нирок або інших органів. Рівень альбумінів у сироватці крові також може характеризувати протеїнсинтезувальну функцію печінки [7].

Мета дослідження. Вивчити деякі біохімічні параметри крові лабораторних тварин за умов передзабійного стресу. Одержані результати можуть бути застосовані для вивчення механізмів передзабійного стану на лабораторних і домашніх тваринах з метою створення біологічно активних кормових добавок та одержання екологічно безпечної для споживання людиною продукції тваринництва.

Матеріали й методи дослідження. Дослідження проводили на білих статевозрілих лабораторних щурах-самках лінії Вістар масою тіла 180–220 г, яких утримували в стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло за температури 20–22 °C і вільним доступом до питної води та корму. Тваринам згодовували стандартний гранульований комбікорм для лабораторних тварин. Сформовано три дослідні групи (по п'ять тварин у кожній). Щурів із кожної клітки брали одночасно й почергово – від першої до п'ятої тварини. У спеціально обладнаному ізольованому приміщенні віварію здійснювали декапітацію тварин під етерним наркозом. Інші тварини не спостерігали за декапітацією. Кров для досліджень брали у ділянці декапітації.

У плазмі крові тварин проводили розділення протеїнових фракцій у пластинах 7,5% поліакриламідного гелю (ПААГ), визначали активність амінотрансфераз (АлАТ, К.Ф.2.6.1.2 та АсАТ, К.Ф.2.6.1.1) за методом Райтман–Френкеля, вміст загального білка – біуретовим реактивом. Концентрацію вільного кортизолу визначали за допомогою набору ІФА (EIA-1887, Cortisol ELISA) для прямого кількісного визначення методом імуноферментного аналізу в плазмі крові. Твердофазний ензимзв'язаний імуносорбційний набір створений за принципом конкуренції. Лунки на мікропланшетці вкриті моноклональним антитілом проти антигенів молекул кортизолу. Зразок плазми крові з ендogenous кортизолом інкубували в лунці разом з ензимним кон'югатом. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивали водою. Кількість зв'язаної пероксидази обернено пропорційна концентрації кортизолу в зразку. Після додавання субстрату змінювалась інтенсивність забарвлення, що обернено пропорційна концентрації кортизолу в досліджуваному зразку [4].

Результати досліджень аналізували за допомогою пакета програм Statistica 6.0 і Microsoft Excel for Windows XP. Вірогідність різниць оцінювали за t -критерієм Стюдента. Результати вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Під час експерименту дотримувались усіх біоетичних норм згідно з Європейською конвенцією “Про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною і науковою метою” (Страсбург, 1986) і “Загальними етичними принципами експериментів на тваринах”, ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (Київ, 2006) та принципами гуманності, викладеними в директиві Європейської Спільноти [10].

Результати дослідження та їх обговорення. Концентрації кортизолу в плазмі крові щурів визначали залежно від порядку взяття тварин із кліток. При цьому рівень гормону коливався від 34,97 (перші тварини з кожної групи) до 178,9 нг/мл (п’яті тварини кожної групи, яких брали з кліток останніми) (рис. 1). Концентрація кортизолу в плазмі крові щурів, яких брали з кліток другими з кожної групи, зростала порівняно з показниками щурів, яких брали першими. У щурів, яких брали з кліток п’ятими з кожної групи, рівень кортизолу вірогідно підвищився майже у 1,5 разу ($p < 0,01$) порівняно з показниками щурів, яких брали четвертими, та у 5 разів ($p < 0,01$), тобто з $34,97 \pm 21,364$ до $178,9 \pm 20,687$, порівняно з показниками щурів, яких брали з кліток першими.

У експериментах на лабораторних тваринах фіксували найбільшу різницю коливання рівня кортизолу між тваринами, яких брали з кліток першими та п’ятими, що свідчить про наявність найбільшого передзабійного стресу у тварин, яких брали з клітки останніми.

Рис. 1. Уміст кортизолу в плазмі крові щурів залежно від порядку взяття із клітки перед забоєм ($M \pm m$, $n = 5$), нг/мл

Примітка: 1, 2, 3, 4, 5 – тварина; ** – $p < 0,001$ (між четвертими та п’ятими тваринами).

Результати досліджень показали, що у щурів, яких брали із кліток останніми, тобто п’ятими, виявлено певні зміни у співвідношенні протеїнових фракцій: у плазмі крові вірогідно зменшився відсотко-

вий вміст α -глобулінів від 32,04 (перша тварина) до 19,99 % (п'ята тварина) – в 1,6 разу ($p < 0,05$), β - і γ -глобулінів відповідно: від 24,6 до 11,52 % – в 2,1 разу та від 24,6 до 10,94 % – у 2,4 разу ($p < 0,05$). Водночас зростав вміст фракції альбумінів у 1,8 разу ($p < 0,01$) у плазмі крові тієї ж групи тварин, тобто у щурів, яких брали з кліток останніми.

Рис. 2. Співвідношення протеїнових фракцій у плазмі крові щурів (%; $M \pm m$; $n = 5$)

Примітка: статистично вірогідні різниці: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Відомо, що приблизно 75 % глюкокортикоїдів зв'язано з транскортином, 10 % – з альбуміном крові, 6–7 % – з еритроцитами та лейкоцитами і лише 5–10 % є у вільному (незв'язаному) стані. Вважається, що активною формою гормону є його вільна форма [11].

Деякі біохімічні параметри крові щурів ($M \pm m$, $n = 5$)

Показники	Тварини				
	1-ша	2-га	3-тя	4-та	5-та
АлАТ, Мккат/л	0,77 $\pm$ 0,103	0,91 $\pm$ 0,124	0,79 $\pm$ 0,158	0,91 $\pm$ 0,142	0,88 $\pm$ 0,078
АсАТ, Мккат/л	0,88 $\pm$ 0,109	0,96 $\pm$ 0,021	0,89 $\pm$ 0,110	0,97 $\pm$ 0,057	0,97 $\pm$ 0,120
Гемоглобін, г/л	126,75 $\pm$ 2,976	129,50 $\pm$ 2,440	127,88 $\pm$ 0,375	129,75 $\pm$ 1,635	126,50 $\pm$ 1,732
Еритроцити, млн/мкл	5,16 $\pm$ 0,093	5,12 $\pm$ 0,080	5,03 $\pm$ 0,053	5,31 $\pm$ 0,350	5,12 $\pm$ 0,154
Загальний протеїн, г/л	62,88 $\pm$ 0,942	63,63 $\pm$ 2,569	64,32 $\pm$ 3,395	61,16 $\pm$ 1,864	63,29 $\pm$ 3,383

Вірогідних змін активності амінотрансфераз (АлАТ і АсАТ), концентрації загального протеїну та гемоглобіну, кількості еритроцитів у тварин усіх груп не спостерігали.

З отриманих результатів досліджень випливає, що передзабійний стрес призводить до змін концентрації кортизолу та протеїнових фракцій у плазмі крові щурів. За умов проведення досліджень на сільсько-

господарських тваринах необхідно враховувати їх передзабійний стан, який може змінювати окремі біохімічні параметри організму і таким чином впливати на якість отриманої від цих тварин продукції.

Висновки. У плазмі крові щурів, яких брали з кліток останніми, порівняно з першими, вміст кортизолу підвищився у 5 разів ($p < 0,01$), вірогідно зменшився відносний вміст α -, β - і γ -глобулінів, натомість збільшився вміст фракції альбумінів. Перспективним напрямом є вивчення особливостей стану організму сільськогосподарських тварин перед їх забоєм для створення біологічно активних добавок, які б нівелювали передзабійний стрес з метою отримати якісну тваринну продукцію.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А. Стресс : природа, биологическая роль, механизмы, исходы : учеб. пособие / В.А. Барабой. – К. : Фітоцентр, 2006. – 424 с. (*Baraboj V. Stress : Nature, biological role, mechanisms and outcomes / V. Baraboj. – K. : Fitosociocentr, 2006. – 424 p.*).
2. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – М. : Высш. шк., 1991. – 399 с. (*Buresh Ja. Techniques and basic experiments on the brain and behavior // Ja. Buresh, O. Bureshova, D.P. Hjuston. – M.: Vysshaja shkola, 1991 – 399 p.*).
3. Грабовська О.С. Неспецифічна резистентність та вміст окремих гормонів у крові бугайців за умов корекції передзабійного стресу / О.С. Грабовська, С.С. Грабовський // Біологія тварин. – 2015. – Т. 17. – № 2. – С. 43–49 (*Grabovska O. Nonspecific resistance and some hormones content level in cattle blood under pre-slaughter stress correction / O. Grabovska, S. Grabovskyi // The Animal Biology. – 2015. – Vol. 17, N 2. P. 43–49*).
4. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич [та ін.]; за ред. В.В. Влізла. – Львів : Сполом, 2012. – 764 с. (*Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary: Reference book; Edited by V. Vlizlo / Vlizlo V., Fedoruk R., Ratych I. [et al.]. – Lviv : SPOLOM. – 2012. – 764 p.*).
5. Cannon W.B. The James-Lange theory of emotions: A critical examination and an alternative / W.B. Cannon // American Journal of Psychology. – 1927. – Vol. 39. – P. 106–124.
6. Crawley J.N. Exploratory behavior models of anxiety in mice / J.N. Crawley // Neurosci. Biobehav. Revs. – 1985. – Vol. 9. – P. 33–44.
7. Das S.K. Effects of long term ethanol consumption on cell death in liver / S.K. Das, S. Mukherjee, D.M. Vasudevan // Clin. Biochem. – 2011. – Vol. 26, N 13. – P. 84–87.
8. Ferguson D.M. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? / D.M. Ferguson, R.D. Warner // Meat Science. – 2008. – Vol. 80, N 1. – P. 12–19.
9. Greenshaw A.J. Animal models for assessing anxiolytic, neuroleptic and antidepressant drug action / A.J. Greenshaw, T.V. Nguyen, D.J. Sanger // In : A.A. Boulton, G.B. Baker, R.T. Coutts. Neuromethods. Analysis of Psychiatric drugs. – Clifton. N.J. : Humana press, 1988. – Vol. 10. – P. 379–427.
10. Minni A.M. Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: impact on memory retrieval / A.M. Minni, R. Dorey, C. Piérard [et al.] // Endocrinology. – 2012. – Vol. 153, N 10. – P. 4766–4774.
11. Official Journal of the European Union L276/33. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609/EC. 20.10.2010.
12. Ousova O. Corticosteroid binding globulin: a new target for cortisol-driven obesity / O. Ousova, V. Guyonnet-Duperat, N. Iannuccelli [et al.] // Mol. Endocrinol. – 2004. – Vol. 18, N 7. – P. 1687–1696.
13. Porsolt R.D. Psychotropic screening procedures / R.D. Porsolt, R.A. McArthur, A. Lenegre, F. van Haaren // Methods in Behavioral Pharmacology. – New York : Elsevier, 1993. – P. 23–51.
14. Qian X. A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress / X. Qian, S.K. Droste, M. Gutierrez-Mecinas [et al.] // Endocrinology. – 2011. – Vol. 152, N 10. – P. 3738–3748.
15. Ritchie R. Wellness assessment: Targeted testing for specific problems which are not the measurement of health. Serum Proteins in Clinical Medicine. Clinical Section. Foundation for Blood Research / R. Ritchie // Publishers : Scarborough. – 1999. – II. – P. 120.00-1–120.00-9.
16. Schaefer A.L. Role of nutrition in reducing antemortem stress and meat quality aberrations / A.L. Schaefer, P.L. Dubeski, J.L. Aalhus, A.K.W. Tong // J. Anim. Sci. Agriculture and Agri-Food Canada, Lacombe Research Centre, Lacombe, Alberta, Canada T4L 1W1. – 2001. – Vol. 79. – P. 91–101.
17. Stahl S.M. Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical application / S.M. Stahl. – 3rd ed. Cambridge : Cambridge University Press. – 2008. – P. 1117.
18. Wesoly R. Pre-slaughter conditions influence skatole and androstenone in adipose tissue of boars / R. Wesoly, I. Jungbluth, V. Stefanski, U. Weiler // Meat science. – 2015. – N 99. – P. 60–67.

Biochemical Indices of Laboratory Animals Blood at Pre-Slaughter Stress

S. GRABOVSKYI¹, O. GRABOVSKA², A. VELYKA³

¹*S. Gzhytskyi Lviv National University;
of Veterinary Medicine and Biotechnologies,*

²*Institute of Animal Biology NAAS;*

³*Higher State Educational Establishment "Bukovyna State Medical University"*

Human and animal strategy of behavior is based on two reactions: active (aggression and run away) and passive (stand still), which was first described by Cannon in research conducted on cats. But none of these forms of reactions to stress factor is identical to the animal state before slaughter, when the animal feels not only danger but also is in a stalemate (impasse). In our opinion this situation leads to metabolic changes of the whole organism significantly greater than reactions of such forms as aggression, run away or stand still.

The investigations of stress response in laboratory animals preferably is exercised in different series of experimental models of stress, but not enough research is done on metabolic levels of changes in animals at pre-slaughter period.

That is why the purpose of our investigations was: to determine some biochemical parameters changes of laboratory animals' blood under pre-slaughter stress conditions.

The results of determination of biochemical indices (cortisol concentration, protein fractions, activity of alanine and aspartate aminotransferase, total protein, hemoglobin content, erythrocyte count) of stress response in the laboratory animals blood before slaughter are presented in the paper.

Object and research methods. The experiment was conducted on 15 white laboratory mature Wistar female rats weighing 180–220 g with standard diet. The rats were kept under standard vivarium conditions in compliance with the 12-hour mode light dark/light at the temperature of 20–22 °C and free access to drinking water and food. Three groups of rats one month of age (five rats each) was formed for research. The rats of each cage were taken both at one time and alternately – from the first to the fifth animal. Feeding of rats was done on a daily basis. The rats ate food completely. Decapitation was performed under ether anesthesia. Blood samples were taken from the area of decapitation. The rats slaughter was carried out in the morning.

The blood plasma protein fractions separation was carried out by horizontal electrophoresis in polyacrylamide gel (PAAG). Cortisol level were determined in rats blood plasma using a set of ELISA (EIA-1887, Cortisol ELISA).

Mathematical treatment of the research results were processed statistically using the software package Statistica 6.0 and Microsoft Excel for Windows XP. Probability differences was assessed by Student t-test and results considered likely at $p \leq 0.05$.

Because of research it was found that the cortisol concentration reliable changes in the rats' blood plasma depended on the order in which animals were taken from the cage (alternately from the first to the fifth animal) was determined. Herewith hormone level was ranged from 34.97 (the first animals from each cage) to 178.90 ng / ml (the fifth animals which were taken last from each cage). The cortisol level increased nearly by 1.5 times ($p < 0.01$) in the blood plasma of rats, which were taken fourth and fifth from each cage; cortisol level reliable increased nearly by 5 times ($p < 0.05$) in the blood plasma of rats, which were taken first and fifth which were last animals from each cage. The α -, β - and γ -globulins concentration reduced ($p < 0.05$) and albumin fraction concentration increased ($p < 0.01$) in the blood plasma of rats, which were taken last from each cage, was observed.

The results obtained in the model experiment can be used in research of cell immunity indices and stress hormones, such as cortisol, on farm animals for organism resistance increasing and correction of their pre-slaughter stress. The results provide an opportunity to create a biologically active food supplement and to substantiate the necessity ecological and safe animal production obtaining for human needs. These research results are promising.

Key words: rats, pre-slaughter stress, cortisol, protein fractions.