

**ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ
НА КОНЦЕНТРАЦІЮ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ І РІВЕНЬ КОРТИЗОЛУ
У ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕСУ**

С. Грабовський¹, О. Грабовська², Д. Остапів²

*¹Львівський національний університет
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького
вул. Пекарська, 50, Львів 79010, Україна
e-mail: grbss@ukr.net*

*²Інститут біології тварин НААН України
вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна*

У статті представлені результати визначення вмісту протеїнових фракцій і рівня кортизолу у плазмі крові лабораторних тварин, яким додатково до корму додавали біологічно активні речовини рослинного і тваринного походження: екстракт селезінки, екстракти ехінацеї та лимоннику, пророщене зерно. Аерозольне введення екстракту селезінки до корму збільшує концентрацію β- й γ-глобулінів і знижує рівень кортизолу у плазмі крові щурів порівняно з контролем, що може свідчити про зниження стресочутливості перед забоєм. Результати, отримані нами у модельному експерименті на щурах, можуть бути використані у дослідженнях показників клітинного імунітету і концентрації стресових гормонів, зокрема кортизолу, на домашніх тваринах з метою підвищення резистентності організму, корекції та нівелювання стресового стану тварин перед забоєм.

Ключові слова: щури, передзабійний стрес, екстракти селезінки, ехінацеї та лимоннику, білкові фракції, кортизол.

Характерною особливістю всіх живих організмів, яку вони набули у процесі еволюції, є здатність адаптуватися до різних зовнішніх чинників і підтримувати постійність внутрішнього середовища. Є дві найважливіші фізіологічні відповіді на стрес: стимулювання симпатичної нервової системи й активування системи гіпоталамус–гіпофіз–кора наднирників. Стресор збуджує гіпоталамус, продукується речовина, що дає сигнал гіпофізові виділяти у кров адренокортикотропний гормон (АКТГ), під впливом якого корковий шар надниркових залоз секретує кортикоїди [15, 18].

За багатьох стресових ситуацій у сироватці крові змінюється співвідношення протеїнових фракцій, хоча загальний вміст білка залишається стабільним. Основна маса білків плазми крові синтезується у печінці: альбуміни (10–16 г/добу), α-глобуліни, частина β-глобулінів, фібриноген, компоненти системи згортання крові (II, V, VII, IX, X, XI фактори). У клітинах імунної системи синтезується більша частина β- й γ-глобулінів. Вміст білкових фракцій крові є показовим, оскільки має велике значення для діагностики багатьох захворювань. Альбуміни становлять найбільшу частину білків крові, відіграють важливу роль у підтриманні онкотичного тиску крові, у транспортуванні багатьох біологічних речовин: вуглеводів, ліпідів, окремих гормонів, а також мікроелементів (Купрум, Цинк, Магній, тощо) [16]. Тому вміст альбуміну сироватки крові має діагностичне значення, його змен-

шення вказує на дисфункцію печінки, нирок або інших органів. Рівень альбуміну у крові також може характеризувати білоксинтезуючу функцію печінки [7].

Фракція гамма-глобулінів головним чином складається з імуноглобулінів [8, 13, 20]. Збільшення вмісту альфа-глобулінів спостерігається при запальних процесах, стресових впливах на організм (травми, опіки, інфаркт міокарда тощо), а також при деяких хронічних захворюваннях, злоякісних новоутвореннях і при стресах [17]. Тоді як при різних патологічних процесах, зокрема при атеросклерозі, цукровому діабеті, нефротичному синдромі відмічається зниження вмісту альфа-глобулінів і зростання бета-глобулінів. Зміна рівня гамма-глобулінів характерна для захворювань, пов'язаних із виснаженням і пригніченням імунної системи [5, 9].

Особливий інтерес викликають дослідження впливу біологічно активних речовин природного походження на співвідношення білкових фракцій крові та їх корекція у передзабійний період, тобто за стресового стану організму тварини, коли зростає рівень кортизолу [2]. У попередніх дослідженнях нами також встановлено зміни вмісту поліамінів [3] і окремих класів ліпідів [4]. Тому метою роботи було дослідження впливу імуномодуляторів і антистресорів різного походження (екстрактів селезінки, ехінацеї та лимоннику, а також пророщеного зерна) у передзабійний період на білкові фракції у плазмі крові щурів.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на білих статевозрілих самках лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 180–220 г, які утримувались у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло за температури 20–22°C, необмеженим доступом до питної води та корму. Щурам згодували стандартний гранульований комбікорм для лабораторних тварин. Для досліджень було сформовано чотири групи (три дослідні (I, II і III) та контрольну (IV), по п'ять щурів у кожній. Як антистресори й імуномодулятори за п'ять днів до забою тварин використовували такі біологічно активні речовини: екстракт селезінки (I), екстракти ехінацеї та лимоннику (II), які вносили в корм аерозольним розпиленням в об'ємі 0,6 мл/тварину, пророщене зерно (III дослідна група). Тваринам контрольної групи (IV) таким же чином додавали до корму 70° спиртовий розчин в аналогічному об'ємі. Щурам усіх експериментальних груп додатково до стандартного корму давали зерно (10 г/тварину). Поїдання корму тваринами контролювали щоденно. У кінці досліду всіх тварин зважували, почергово декапітували під етерним наркозом і брали кров для аналізів.

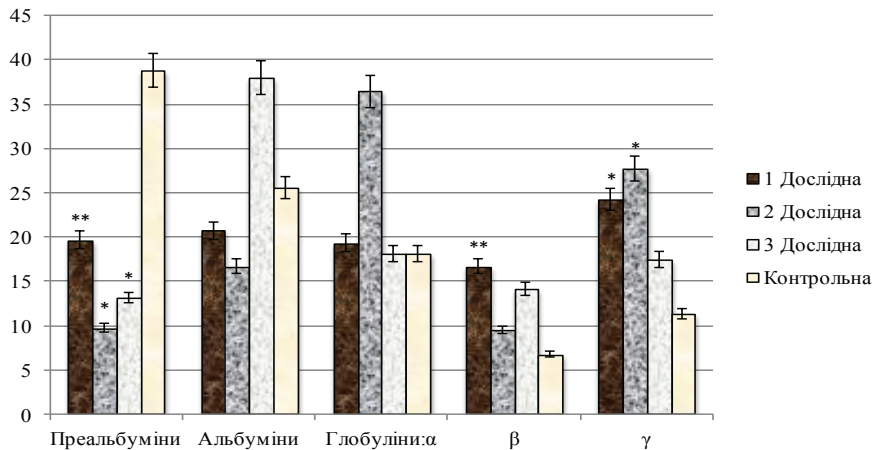
При експерименті були дотримані всі біоетичні норми згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [12].

Електрофоретичне розділення білкових фракцій плазми крові щурів проводили у пластинах 7,5% поліакриламідного гелю (ПААГ). Крім того, у плазмі крові щурів визначали вміст кортизолу за допомогою твердофазного імуноферментного методу імуносорбційним набором, створеним за принципом конкуренції. Зразок плазми крові з ендogenous кортизолом інкубували у лунці разом з ензимним кон'югатом. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивали водою. Кількість зв'язаної пероксидази обернено пропорційна концентрації кортизолу у зразку. Після додавання субстрату змінювалась інтенсивність забарвлення, що обернено пропорційна концентрації кортизолу у досліджуваному зразку [1].

Аналіз результатів досліджень проводили за допомогою пакету програм Statistica 6.0 і Microsoft Excel for Windows XP. Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Результати вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

В експерименті визначали співвідношення протеїнових фракцій плазми крові щурів, яким додатково до корму вносили біологічно активні речовини природного походження. У результаті проведених досліджень встановлено, що у щурів дослідних груп, порівняно з контролем, виявлено деякі зміни у відсоткових співвідношеннях концентрації білкових фракцій. Так, у тварин I дослідної групи, яким додатково згодовували екстракт селезінки, знизилась концентрація преальбумінів удвічі, підвищився рівень β - і γ -глобулінів, відповідно, на 41 і 46%. Зменшення преальбумінової фракції спостерігали у тварин II та III дослідних груп, яким як антистресори й імуномодулятори у передзабійний період додатково до основного раціону додавали екстракти ехінацеї, лимоннику та пророщене зерно. Відмічено зростання концентрації γ -глобулінової фракції на 40% у плазмі крові щурів II дослідної групи ($P \leq 0,05$) (див. рисунок).



Співвідношення окремих білкових фракцій у плазмі крові щурів (%; $M \pm m$; $n=5$). Статистично вірогідні різниці: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$ порівняно з контролем.

Збільшення концентрації глобулінової фракції можна пояснити впливом поліамінів екстракту селезінки — путресцину, сперміну та спермідину, які стимулюють продукування глобулінів [6, 10, 19]. У плазмі крові щурів, які додатково з кормом отримували екстракт селезінки (I дослідна група), рівень кортизолу був вірогідно нижчим ($P < 0,05$) порівняно з контролем, що може свідчити про зниження стресу тварин перед забоєм (див. таблицю).

Рівень кортизолу у плазмі крові щурів перед забоєм, нг/мл, $M \pm m$, $n=5$

Групи	Кортизол, нг/мл
I Дослідна	75,0 \pm 58,8**
II Дослідна	109,0 \pm 64,4
III Дослідна	106,0 \pm 48,2
Контрольна	174,9 \pm 51,9**

Примітка. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$ порівняно з контролем.

Відомо, що глобуліни можуть зв'язувати кортизол. Зменшення концентрації вільного кортизолу у плазмі крові тварин I дослідної групи, яким додатково згодовували екстракт селезінки, пов'язано з підвищенням вмісту глобулінової фракції, що збігається з даними, отриманими при дослідженнях на щурах за умов стресу — вимушеного плавання [14]. Автори відмічають надзвичайно динамічну роль глобулінів, які регулюють концентрацію глюкокортикоїдів під час гострого стресу [11].

Отже, підсумовуючи отримані дані, можна зробити висновок, що використання імуномодуляторів рослинного і тваринного походження знижує негативний вплив передзабійного стресу та підвищує імунітет тварин. Серед застосованих біологічно активних речовин найбільший вплив на тварин за умов стресу мав екстракт селезінки, який містить поліаміни, що власне і є антистресорами й імуномодуляторами у передзабійному стресі. Додаткове введення до корму екстракту селезінки супроводжувалося підвищенням концентрації β - і γ -глобулінів та зниженням рівня кортизолу у плазмі крові щурів порівняно з контролем, що може свідчити про зменшення стресу перед забоєм.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Влізла В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б.* та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / за ред. В.В. Влізла. Львів: Сполом, 2012. 764 с.
2. *Грабовський С. С.* Вплив імуномодуляторів природного походження на показники клітинного імунітету і рівень кортизолу в крові щурів за умов стресу // Біологічні Студії. 2014. Т. 8. № 1. С. 93–102.
3. *Грабовський С. С.* Вміст поліамінів та їх корекція у крові та тканинах курчат-бройлерів за умов стресу // Біологія тварин. 2014. Т. 16. № 2. С. 18–25.
4. *Грабовський С. С.* Вміст окремих класів ліпідів у крові курчат-бройлерів при передзабійному стресі // Біологія тварин. 2013. Т. 15. № 4. С. 24–31.
5. *Клімова О., Звягінцева О., Малишев А.* Зміна співвідношення білкових фракцій сироватки крові у експериментальних тварин різного віку після імунізації цитотоксичною сироваткою хворих з аутоімунним захворюванням – міастенією // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2011. Вип. 55. С. 27–33.
6. *Chowhan R. K., Singh L. R.* Polyamines in modulating protein aggregation // J. Proteins & Proteomics. 2013. Vol. 3. N. 2. P. 124–127.
7. *Das S. K., Mukherjee S., Vasudevan D. M.* Effects of long term ethanol consumption on cell death in liver // Clin. Biochem. 2011. Vol. 26. N 13. P. 84–87.
8. *Kaneko J. J.* Serum proteins and the Dysproteinemias. In: Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. Academic Press, London, UK, 1997. P. 117–138.
9. *Maes M., Wauters A., Neels H.* et al. Total serum protein and protein fractions in depression: relationships to depressive symptoms and glucocorticoid activity // J. Affective Disorders. 1995. Vol. 34. N. 1. P. 61–69.
10. *Matti V., Eija S., Pekka R.* Interaction of polyamines with proteins of human plasma: apreferential aggregation of fibrinogen and fibronectin(cold insoluble globulin) // Biochimie. 1980. Vol. 62. P. 99–104.
11. *Minni A. M., Dorey R., Piérard C.* et al. Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: impact on memory retrieval // Endocrinol. 2012. Vol. 153. N 10. P. 4766–4774.

12. 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.
13. Piccione G., Sciano S., Messina V. et al. Changes in serum total proteins, protein fractions and albumin-globulin ratio during neonatal period in goat kids and their mothers after parturition // *Annals of Animal Science*. 2011. Vol. 11. N 2. P. 251–260.
14. Qian X., Droste S. K., Gutiérrez-Mecinas M. et al. A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress // *Endocrinol*. 2011. Vol. 152. N 10. P. 3738–3748.
15. Reeder D. M., Kramer K. M. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history // *J. Mammal*. 2005. Vol. 86. N 2. P. 225–235.
16. 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. Publishers: Scarborough. 1999. Vol. II. P. 120.00-1–120.00-9.
17. Sanandam M. R. Impact of endotoxin on physiological responses of rat exposed to textile environment // *Int. J. Pharmaceutical Applications*. 2011. Vol. 2. Is. 3. P. 155–158.
18. Sapolsky R. M., Romero L. M., Munck A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions // *Endocr. Rev*. 2000. 21. P. 55–89.
19. Stathakis N. E., Mosesson M. W. Interactions among heparin, cold-insoluble globulin, and fibrinogen in formation of the heparin-precipitable fraction of plasma // *J. Clin. Invest*. 1977. Vol. 60. P. 855–865.
20. Thrall M. A. Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: *Veterinary hematology and clinical chemistry*. (Ed.) Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA. 2004. P. 401–415.

Стаття: надійшла до редакції 16.04.14

доопрацьована 01.08.14

прийнята до друку 11.09.14

NATURAL ORIGIN IMMUNOMODULATORS INFLUENCE ON PROTEIN FRACTIONS CONCENTRATION AND CORTISOL LEVEL IN RATS BLOOD AT PRE-SLAUGHTER STRESS

S. Grabovsky¹, O. Grabovska², D. Ostapiv²

*¹Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies
named after S.Z. Gzhytskyj, 50, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine
e-mail: grbss@ukr.net*

*²Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine*

The results of determination of protein fractions content and cortisol concentrations in plasma of laboratory animals, which further added to the feed of natural origin biologically active substances: spleen, Echinacea and Schisandra chinensis extracts, growing grain, are presented in the article. Aerosol introduction of spleen extract to the rats feed increases the β - and γ -globulin concentration and decreases of cortisol level in the rats blood plasma

in comparison with the control, may indicate about reducing the stress of the animal before slaughter. The results which obtained in model experiment on rats can be used in researches of cell immunity indices and stress hormones, such as cortisol, on farm animals for organism resistance increasing, correction and avoid their pre-slaughter stress.

Keywords: rats, pre-slaughter stress, Echinacea and Schisandra chinensis extracts, protein fractions, cortisol.

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ И УРОВЕНЬ КОРТИЗОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

С. Грабовский¹, А. Грабовская², Д. Остапів²

*¹Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого
ул. Пекарская, 50, Львов 79010, Украина
e-mail: grbss@ukr.net*

*²Институт биологии животных НААН Украины
ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина*

В статье представлены результаты определения содержания белковых фракций и уровня кортизола в плазме крови лабораторных животных, которым дополнительно к корму добавляли биологически активные вещества естественного происхождения: экстракт селезенки, экстракты эхинацеи и лимонника, проросшее зерно. Аэрозольное введение экстракта селезенки в корм увеличивает концентрацию β - и γ -глобулинов и снижает уровень кортизола в плазме крови крыс по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о снижении стресса перед убоем животного. Результаты, полученные нами в модельном эксперименте на крысах, могут быть использованы в исследованиях показателей клеточного иммунитета и концентрации стрессовых гормонов, в частности кортизола, на сельскохозяйственных животных с целью повышения резистентности организма, коррекции и нивелирования стрессового состояния животных перед убоем.

Ключевые слова: крысы, передубойный стресс, экстракты селезенки, эхинацеи и лимонника, белковые фракции, кортизол.