

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

ВЛИЯНИЕ НА АМОНЯКА ВЪРХУ ДИНАМИКАТА
НА НЯКОИ ХЕМАТОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ЗАЙЦИ,
ПОДЛОЖЕНИ НА ПСИХИЧЕСКИ СТРЕСМАРИНА ДЯВОЛОВА, ИВАН ЯНЧЕВ, ПЕНКА МОНЕВА, ДИМИТЪР ГУДЕВ
Институт по животновъдни науки - Костинброд

Често срещани замърсители на въздуха в зайцефермите са прахови частици, ендотоксини, амоняк и въглероден диоксид (Ooms et al., 2008). Препоръчва се максималното количество атмосферен амоняк в помещения за промишлено отглеждане на зайци да не надвишава 25 ppm (Wathes and Charles, 1994) Амонякът се произвежда от уреазо-положителни бактерии във фекалиите и е силен дразнител на горните дихателни пътища, където предизвиква патологични и патохистологични промени (Close et al., 1980). Той потиска свързването на кислорода от хемоглобина чрез влиянието си върху рН на кръвта (Olanrewaju et al., 2008). Повишените нива на амоняка водят до образуването на свободни радикали в астроцитите. Според Murthy et al. (2001) така получените свободни радикали предизвикват патофизиологични промени, свързани с хиперамонемичното състояние. Острата експозиция на амоняк стимулира образуването на NO (свободен радикал), което води до задълбочаване на амонячната токсикоза (Lajtha et al., 2009). Освен това при плъхове, инжектирани с амоняк, се наблюдава понижена активност на глутатион пероксидаза, супероксид дисмутаза и каталаза в мозъка (Kosenko et al., 1997), което показва, че амонякът предизвиква оксидативен стрес в мозъка.

Липсват литературни данни за влиянието на амоняка върху хематологичните показатели при зайци. Противоречиви изследвания са получени при свине (Von Borell et al., 2007; O'Connor et al., 2010; Gustin et al., 1994), пилета (Olanrewaju et al., 2008; McFarlane and

Curtis, 1989; Quarles and Kling, 1973) и коне (Katayama et al., 1995). Липсват данни и за ефекта на амоняка върху динамиката на хематологичните показатели при условия на психически стрес.

Целта на настоящото изследване бе да проучим влиянието на амоняка върху стресовия отговор (кучешки лай и живо куче) при зайци, отглеждани при ниски и високи нива на амоняк.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването бе осъществено с 24 мъжки зайци (*Oryctolagus cuniculus*) от породата Бял новозеландски, отглеждани в Експерименталната база на Института по животновъдни науки – Костинброд. Експерименталните животни бяха хранени на воля с целодажбени гранулирани смески. Зайците бяха отглеждани в индивидуални клетки с решетъчен под, снабдени с хранилки и нипелни поилки.

Експериментът бе проведен през пролетно-летния сезон. Животните бяха разпределени в две групи с 12 заека във всяка. Зайците от експерименталната група бяха отглеждани в помещение с висока концентрация на амоняк във въздуха – 20-54 ppm, естествено освобождаван от постелята. Животните от контролната група бяха отглеждани при ниски нива на амоняк – 1.5-7.2 ppm, поддържани чрез всекидневно почистване на помещението и подобряване на вентилацията чрез отваряне на вратите и прозорците.

На 40-тия ден от началото на експеримента половината зайци от контролната група (6 броя)

бяха стресирани чрез 1-минутен запис на кучешки лай с трикратно 110 dB възпроизвеждане, а останалите 6 заека бяха подложени на стрес чрез въвеждане на куче в помещението и задържането му там в продължение на 30 min. Същата схема бе приложена и при животните от експерименталната група.

Бяха взети кръвни проби 10 дни преди стресовия епизод (базално ниво) и двукратно след стресиране – на 30-тата минута и 3-тия час. Пробите кръв бяха взети от ушната вена в епруветки Vacutube EDTA-Na 5ml. Непосредствено след вземането на кръв бяха направени кръвни натривки. Натривките бяха оцветени по метода на May-Grunvald и Gimsa (**Lucas and Jamroz, 1961**). На всяка натривка бяха преброени 400 левкоцити, включващи неутрофили, еозинофили, базофили, лимфоцити и моноцити. Определени бяха следните показатели: хематокрит, общ брой еритроцити, общ брой левкоцити и съотношение неутрофили: лимфоцити (Н:Л). Общият брой еритроцити и левкоцити бяха определени с мануална цитометрична броителна камера. Хематокритът беше измерен чрез микрохематокритен метод.

През целия опитен период в помещенията за отглеждане на зайци се контролираха следните абиотични показатели: температура, влажност, съдържание на въглероден диоксид и амоняк във въздуха, които варираха съответно в следните граници 16-24°C, 41-66% влажност и 520-1100 ppm CO₂. Температурата на въздуха, относителната влажност и въглеродния диоксид се измерваха с апарата „Indoor Air Quality Portable Monitor SM-2100” на фирмата SenseCube. Атмосферният амоняк се измерваше чрез „AeroQual S200” монитор, снабден със сензорна глава за амоняк (чувствителност: 0-100±0.1 ppm).

Резултатите бяха обработени статистически с еднофакторен анализ, като бе използван *t*-тестът на Стюdent. Получените резултати са представени като mean±SEM.

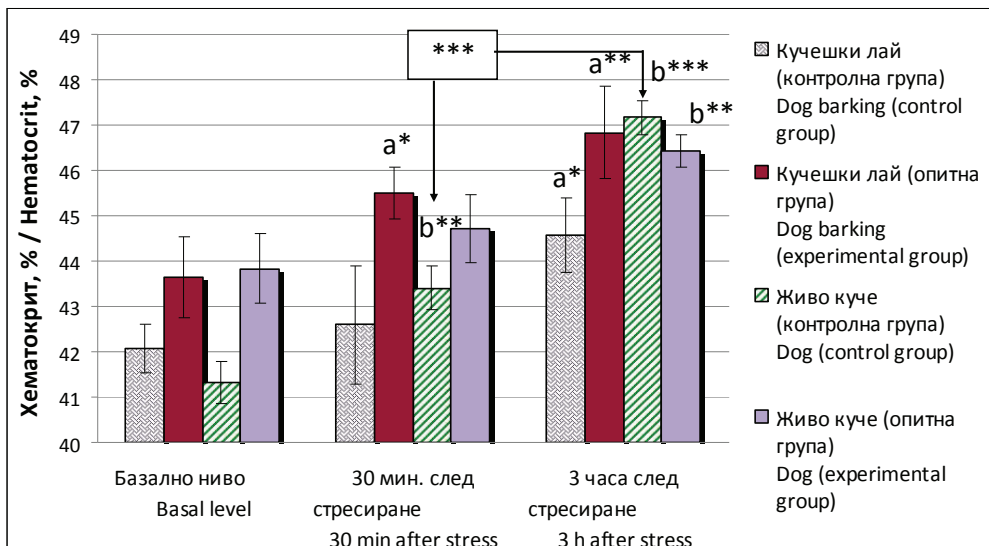
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При животните от опитната група, стресирани с кучешки лай (фиг. 1), се наблюдава дока-

зано нарастване на хематокритните стойности 30 min след стресиране ($P<0.05$), като тенденцията за повишаване продължава и на 3-тия час ($P<0.01$). При контролната група, стресирана с кучешки лай, се отчита тенденция за покачване на хематокрита, който достига статистически доказана стойност на 3-тия час след стресирането ($P<0.05$). Отчетените промени в нивата на хематокрита не съответстват на промените в броя на еритроцитите (фиг. 2), при които се регистрира доказан спад при контролната група, между 30-та минута и 3-тия час след стресиране. Повишението на хематокрита при експерименталната група след психически стрес (фиг. 1) е адаптивен отговор към повишената нужда от кислород, предизвикана от засиления метаболизъм. Освен това повишените стойности на хематокрита при експерименталните зайци на 30-тата минута след стресиране с кучешки лай, за разлика от контролните зайци, при които нивото на хематокрита остана непроменено, показват че амонякът повлиява динамиката на хематокрита при стрес.

При зайците, стресирани с въвеждане на куче в помещението (фиг. 1), се отчита доказано повишаване на хематокрита при контролната група на 30-тата минута ($P<0.01$) и 3-тия час след стресиране ($P<0.001$), а при опитната група – на 3-тия час след стресирането ($P<0.01$). Има доказана разлика в хематокритната стойност между 30-тата минута и 3-тия час след стресиране с куче при контролната група ($P<0.001$). Тук, както и при стресирането с кучешки лай, се наблюдава несъответствие на стойностите на хематокрита с броя на еритроцитите (фиг. 2). Следователно, може да се предположи, че получените резултати са следствие от увеличаване обема на еритроцитите или намаляване на плазмения обем в резултат на влиянието на амоняка върху киселинно-алкалното равновесие (**Roberts, 2001**).

Olanrewaju et al. (2008) установяват повишени нива на хемоглобин и хематокрит при пилета, изложени на нарастващи нива на амоняк (0, 25 и 50 ppm) в продължение на 14 дни. Авторите предполагат, че наблюдаваното повишение на хематокрита се дължи на засилване на

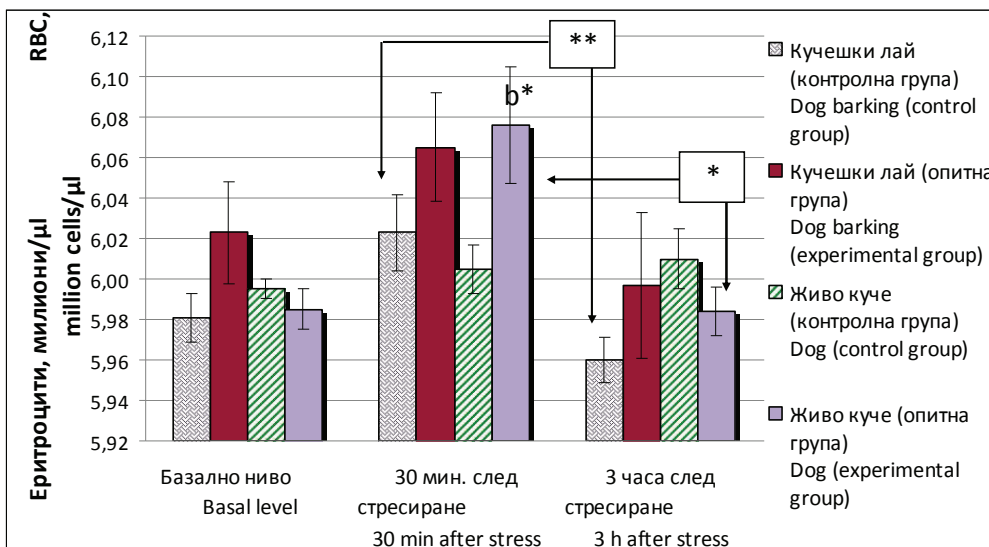


Фиг. 1. Стойности на хематокрита при зайци, отглеждани при ниски (контролна група) и високи (експериментална група) нива на амоняк и стресирани с кучешки лай и въвеждане на живо куче в помещенията за отглеждане * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

a, b – достоверна разлика спрямо съответната базална стойност

Fig. 1. Hematocrit values in rabbits reared under low (control group) and high (experimental group) ammonia levels. Rabbits from both groups were stressed with playback recording of dog barking and introduction of a dog in the room * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

a, b – significantly different versus the corresponding basal level



Фиг. 2. Брой еритроцити при зайци, отглеждани при ниски (контролна група) и високи (експериментална група) нива на амоняк и стресирани с кучешки лай и въвеждане на живо куче в помещенията за отглеждане * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

b – достоверна разлика спрямо базалната стойност

Fig. 2. Red blood cell count in rabbits reared under low (control group) and high (experimental group) ammonia levels. Rabbits from both groups were stressed with playback recording of dog barking and introduction of a dog in the room * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

b – significantly different versus the corresponding basal level

еритропоезата като компенсаторен механизъм във връзка с намаляването на кислорода в тъканите. В нашия случай е изключена възможността за интерпретиране на увеличената стойност на хематокрита след стрес със стимулиране на еритропоезата, защото реалното увеличение на еритроцитите при стимулиране на еритропоезата настъпва поне 7 дни от момента на стимулирането на този процес, а продължителността на стресовия период в нашата експериментална постановка е само 3 h. **Sriram et al.** (2011) доказват, че слабите вариации в хематокритните стойности могат да доведат до значително повишение на NO в стените на кръвоносните съдове, водещо до вазодилатация.

При животните от експерименталната група, стресирани с въвеждане на куче в помещението (фиг. 2), се отчита доказано повишаване на броя на еритроцитите 30 min след стресиране ($P < 0.05$) и последващ спад на 3-тия час след стресовия епизод ($P < 0.05$). Най-вероятно бързата промяна в броя на еритроцитите е обусловена от промяна в плазменния обем. Основанията за това са, че амониякът предизвиква оксидативен стрес и увреждане на тъканите (**Subash and Subramanian**, 2008). В червените кръвни клетки оксидативният стрес предизвиква окисляване на хемоглобина, мембранните липиди и протеини. Тези данни подкрепят теорията, че повишените хематокритни нива при опитната група (фиг. 1) се дължат на промяна в пропускливостта на еритроцитните мембрани. Повишаването на хематокрита след стрес може да се обясни и чрез предизвикана от NO деформация на еритроцитите (**Bor-Kucukatay et al.**, 2003) и реологията на кръвта, тъй като амониякът стимулира производството на NO (**Monfort et al.**, 2002). При контролната група, стресирана с кучешки лай, съществува тенденция за покачване броя еритроцити на 30-тата минута след стрес, но на 3-тия час се отбелязва доказан спад спрямо стойността, измерена на 30-тата минута ($P < 0.01$).

При контролната група, стресирана с кучешки лай, се наблюдава доказано повишаване броя на левкоцитите (фиг. 3) на 3-тия час след стресирането ($P < 0.05$) спрямо базалното ниво

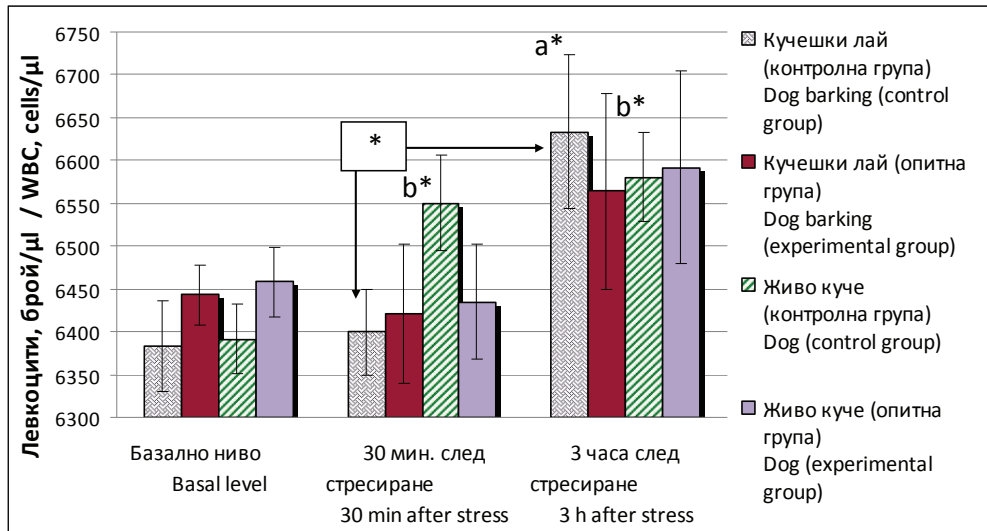
и стойността, измерена 30 min след стрес.

Доказан ръст в броя на левкоцитите при контролната група, стресирана с въвеждане на куче, се отчита както на 30-тата минута, така и на 3-тия час след стресиране. Наблюдаваните различия между резултатите, получени от двата стресора – запис на кучешки лай и въвеждане на куче в помещенията за отглеждане, показват, че живото куче е по-силният психически стресор.

При експерименталните животни не е установено статистически доказано повишаване на броя на левкоцитите спрямо тестираните стресови въздействия (фиг. 3). Тези резултати са в противоречие с наблюдаваното от **Von Borell et al.** (2007) покачване на общия брой бели кръвни клетки при свине, експозирани на 35 ppm амонияк.

Наблюдаваните различия вероятно се дължат на факта, че отчетеният от изследователите скок в броя на левкоцитите е съпроводен с повишение на плазмените нива на кортизола. При предишно наше изследване (**Dyavolova et al.**, 2013) не установихме повишение на кортизола при зайци, отглеждани при високи нива на амонияк и стресирани с кучешки лай.

Доказано е, че стресът понижава броя на лимфоцитите и повишава броя неутрофили (**Dhabhar et al.**, 1995). Обратно на това твърдение, през 1994 г. **Gustin et al.** (1994) докладват, че не се откриват разлики в диференциалната кръвна картина и броя левкоцити при свине, изложени на различни концентрации амонияк (0, 25, 50 и 100 ppm). Това разминаване в данните може да се обясни със стимулиращия ефект на амонияка върху синтеза на азотен оксид, който от своя страна намалява активността на глутамин синтетазата (**Monfort et al.**, 2002). Известно е, че глюкокортикоидните хормони кортизол и кортикостерон повишават съотношението неутрофили: лимфоцити след стрес (**Dhabhar et al.**, 1995), но още не е разкрит механизъмът на този ефект. Ние предполагаеме, че глюкокортикоидите упражняват този ефект чрез потискане синтезата на NO (**Korhonen et al.**, 2002), което от своя страна води до значително повишаване броя на неутрофили и до слабо понижаване

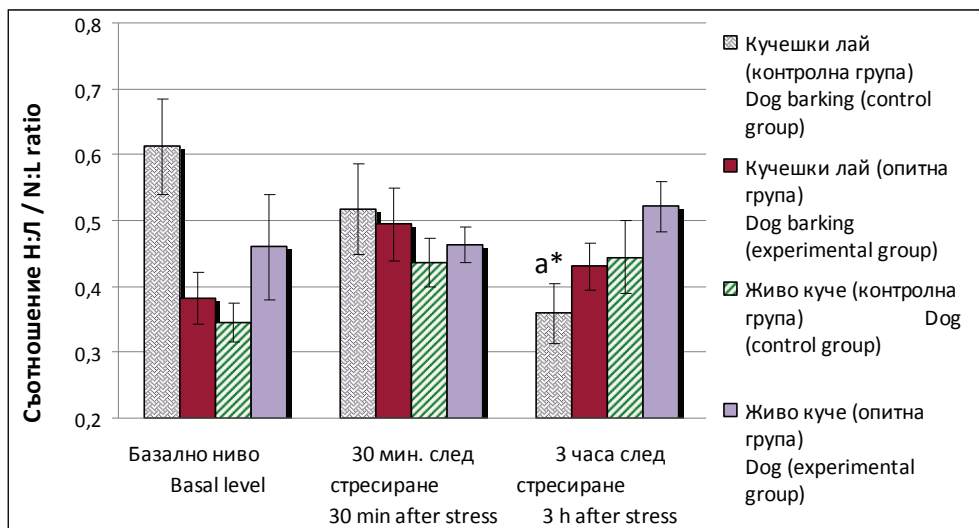


Фиг. 3. Общ брой левкоцити при зайци, отглеждани при ниски (контролна група) и високи (експериментална група) нива на амоняк и стресирани с кучешки лай и въвеждане на куче в помещени- ята за отглеждане * $P < 0.05$

a, b – достоверна разлика спрямо съответната базална стойност

Fig. 3. White blood cell count in rabbits reared under low (control group) and high (experimental group) ammonia levels. Rabbits from both groups were stressed with playback recording of dog barking and introduction of a dog in the room * $P < 0.05$

a, b – significantly different versus the corresponding basal level



Фиг. 4. Съотношение неутрофили: лимфоцити при зайци, отглеждани при ниски (контролна група) и високи (експериментална група) нива на амоняк и стресирани с кучешки лай и въвеждане на живо куче в помещенията за отглеждане * $P < 0.05$

a – достоверна разлика спрямо базалната стойност

Fig. 4. Neutrophil to lymphocyte ratio in rabbits reared under low (control group) and high (experimental group) ammonia levels. Rabbits from both groups were stressed with playback recording of dog barking and introduction of a dog in the room * $P < 0.05$

a – significantly different versus the corresponding basal level

на броя на лимфоцитите (Geffner et al., 1995). Амонякът, за разлика от глюкокортикоидите, стимулира продукцията на азотен оксид (Swamy et al., 2005), като по този начин маскира типичното при стрес повишение на съотношението неутрофили: лимфоцити. От своя страна ендогенният NO потиска стероидогенезата в надбъбречната *zona fasciculata* (Adams et al., 1992). Изложената хипотеза обяснява наблюдаваните хематологични промени в експериментите със свине (Gustin et al, 1994, Von Borel et al., 2007) и пилета (Olanrewaju et al., 2008), подложени на високи концентрации амоняк, при които хематологичните параметри и нивата на кортизола, типични за класическия стресов отговор, са променени от действието на амоняка.

Тази интерпретация е в съответствие с установения спад на съотношението неутрофили: лимфоцити при контролната група ($P < 0.05$), стресирана с кучешки лай, на 3-тия час след стресовото въздействие в сравнение с базалното ниво (фиг. 4).

Не се наблюдават доказани промени в съотношението неутрофили: лимфоцити при двете групи зайци. Получените резултати при стресиране с кучешки лай и въвеждане на живо куче са еднопосочни в смисъл, че не се повишава съотношението неутрофили: лимфоцити след стрес.

ИЗВОДИ

Амонякът променя динамиката на някои хематологични показатели при зайци, подложени на психически стрес.

Съотношението неутрофили: лимфоцити не може да се използва като индиректен стрес-маркер при зайци, подложени на психически стрес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams, M. L., B. Nock, R. Truong, T. J. Cicero, 1992. Nitric oxide control of steroidogenesis: endocrine effects of N G-nitro-l-arginine and comparisons to alcohol. Life sciences, 50 (6), 35-40.

2. Bor-Kucukatay, M., R. B. Wenby, H. J. Meiselman, O. K. Baskurt, 2003. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 284 (5), 1577-1584.

3. Close, L. G., F. I. Catlin, A. M. Cohn, 1980. Acute and chronic effects of ammonia burns on the respiratory tract. Archives of Otolaryngology, 106 (3), 151-158.

4. Dhabhar, F. S., A. H. Miller, B. S. McEwen, R. L. Spencer, 1995. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. The Journal of Immunology, 154 (10), 5511-5527.

5. Dyavolova, M., D. Gudev, I. Yanchev, P. Moneva, 2013. Functional activity of the adrenal glands, rectal temperature and some hematological indices in rabbits reared under low and high indoor ammonia levels. 10th International Symposium Modern Trends in Livestock Production, Belgrade, Serbia. Proceedings, 1225-1237.

6. Geffner, J. R., A. S. Trevani, I. De D'Elia, M. Diament, D. Klein, M. Giordano, 1995. Involvement of nitric oxide in the regulation of peripheral blood leukocyte counts. Journal of leukocyte biology, 58 (4), 391-394.

7. Gustin, P., B. Urbain, J. F. Prouvost, M. Ansay, 1994. Effects of atmospheric ammonia on pulmonary hemodynamics and vascular permeability in pigs: Interaction with endotoxins. Toxicology and applied pharmacology, 125 (1), 17-26.

8. Katayama, Y., M. A. Oikawa, T. Yoshihara, A. Kuwano, S. Hobo, 1995. Clinico-Pathological Effects of Atmospheric Ammonia Exposure on Horses. Journal of Equine Science, 6 (3), 99-104.

9. Korhonen, R., A. Lahti, M. Hämäläinen, H. Kankaanranta, E. Moilanen, 2002. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. Molecular pharmacology, 62 (3), 698-704.

10. Kosenko, E., M. Kaminsky, A. Kaminsky, M. Valencia, L. Lee, C. Hermenegildo, V. Felipo, 1997. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. Free radical research, 27 (6), 637-644.

11. **Lajtha, A., G. Tettamanti, G. Goracci** (Eds.), 2009. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Lipids (Vol. 14). Springer Science & Business Media.
12. **Lucas, A. M., C. Jamroz**, 1961. Atlas of avian hematology. US Dept. of Agriculture Monograph 25.
13. **McFarlane, J. M., S. E. Curtis**, 1989. Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil: lymphocyte ratio. Poultry Science, 68 (4), 522-527.
14. **Monfort, P., E. Kosenko, S. Erceg, J. J. Canales, V. Felipo**, 2002. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. Neurochemistry international, 41 (2), 95-102.
15. **Murthy, C. R., K. V. Rama Rao, G. Bai, M. D. Norenberg**, 2001. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. Journal of neuroscience research, 66 (2), 282-288.
16. **O'Connor, E. A., M. O. Parker, M. A. McLeman, T. G. Demmers, J. C. Lowe, L. Cui, E. L. Davey, R. C. Owen, C. M. Wathes, S. M. Abeyesinghe**, 2010. The impact of chronic environmental stressors on growing pigs, *Sus scrofa* (Part 1): stress physiology, production and play behaviour. Animal, 4 (11), 1899-1909.
17. **Olanrewaju, H. A., J. P. Thaxton, W. A. Dozier, J. Purswell, S. D. Collier, S. L. Branton**, 2008. Interactive effects of ammonia and light intensity on hematochemical variables in broiler chickens. Poultry science, 87 (7), 1407-1414.
18. **Ooms, T. G., J. E. Artwohl, L. M. Conroy, T. M. Schoonover, J. D. Fortman**, 2008. Concentration and emission of airborne contaminants in a laboratory animal facility housing rabbits. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS, 47 (2), 39.
19. **Quarles, C. L., H. F. Kling**, 1974. Evaluation of ammonia and infectious bronchitis vaccination stress on broiler performance and carcass quality. Poultry Science, 53 (4), 1592-1596.
20. **Sriram, K., B. Y. S. Vázquez, O. Yalcin, P. C. Johnson, M. Intaglietta, D. M. Tartakovsky**, 2011. The effect of small changes in hematocrit on nitric oxide transport in arterioles. Antioxidants and redox signaling, 14 (2), 175-185.
21. **Subash, S., P. Subramanian**, 2008. Effect of morin on the levels of circulatory liver markers and redox status in experimental chronic hyperammonaemic rats. Singapore medical journal, 49 (8), 650-655.
22. **Swamy, M., A. Z. Zakaria, C. Govindasamy, K. N. S. Sirajudeen, H. A. Nadiger**, 2005. Effects of acute ammonia toxicity on nitric oxide (NO), citrulline-NO cycle enzymes, arginase and related metabolites in different regions of rat brain. Neuroscience research, 53 (2), 116-122.
23. **Von Borel, E., A. Ozpinar, K. M. Eslinger, A. L. Schnitz, Y. Zhao, M. Mitloehner**, 2007. Acute and prolonged effects of ammonia on hematological variables, stress responses, performance and behavior of nursery pigs. J. Swine Health Prod., 15 (3), 137-145.
24. **Wathes, C. M., D. R. Charles**, 1994. Livestock housing, *CABI Publishing*, Wallingford UK.

EFFECT OF AMMONIA ON THE DINAMICS OF SOME HEMATOLOGICAL INDICES IN RABBITS, EXPOSED TO PSYCHIC STRESS

M. Dyavolova, I. Yanchev, P. Moneva, D. Gudev
Institute of Animal Science - Kostinbrod

SUMMARY

Commercially farmed animals are frequently reared in conditions that impose a number of concurrent environmental stressors. For rabbits housed in closed premises, elevated levels of noise and atmospheric ammonia are common. The aim of this experiment was to assess the effect of psychic stressors, such as dog barking and introduction of a dog in the rabbits' living premises, on some hematological indices, frequently used as indirect stress indicators. The experiment took place against the background of different levels of ammonia, naturally occurring during rabbits' lifespan. Twenty four New Zealand male rabbits were evenly distributed into 2 groups – control, reared under low air ammonia levels (1.5-7.2 ppm) and experimental group, reared under high air ammonia levels (20-54 ppm). Forty days after the start of the experiment all rabbits were subjected to stress by playback recording of dog barking or by introduction of a dog in the room. Blood samples were collected 10 days prior to the stress episode (basal level) and 30 min and 3 h after the end of stress exposure. Hematocrit, red blood cell count (RBC), white blood cell count (WBC) and neutrophil: lymphocyte ratio were determined. Higher hematocrit and leucocyte values were found in the control rabbits at the 3rd h after exposure to dog barking ($P<0.05$), that was accompanied by a decline in N:L ratio ($P<0.05$). There was a drop in the erythrocyte count between 30 min and 3 h after stress ($P<0.01$). The experimental group, stressed with dog barking showed higher hematocrit levels 30 min ($P<0.05$) and 3 h ($P<0.01$) after the stress episode. Higher hematocrit and leucocyte values were found in control rabbits at 30 min ($P<0.01$; $P<0.05$) and 3 h ($P<0.001$; $P<0.05$) respectively, following exposure to dog presence. Leucocyte count was also higher 30 min and 3 h after stress ($P<0.05$). The experimental group had higher hematocrit levels at 3 h following exposure to stress ($P<0.01$). The erythrocyte count increased 30 min after stress ($P<0.05$) and declined on the 3rd h ($P<0.05$).