

Влияние концентрации пищевых белков и жиров на гормональные и окислительные биомаркеры стресса в крови собак-поводырей во время тренировок

Б. Чиофало¹, Э. Фацио¹, П. Ломбарди², С. Кучинотта¹, В. Мастеллоне², А.Р. Ди Роза¹, К. Кравана¹

¹ Факультет ветеринарных наук, Университет Мессины (Мессина, Италия).

² Факультет ветеринарной медицины и животноводства, Университет Неаполя Федерико II (Неаполь, Италия).

Мы сравнили влияние различных стратегий кормления на гормональные показатели и биомаркеры окислительного стресса у собак-поводырей во время специализированных программ дрессировки. Восемь кастрированных взрослых собак породы лабрадор-ретривер были разделены в процессе тренировок на две однородные группы по полу (2 самца, 2 самки), возрасту (17 месяцев ± 1), начальной массе тела (26,3 кг ± 1) и ОСТ (оценка состояния тела) (4,5 из 9 ± 0,11) и получили два коммерческих рациона с различной концентрацией энергетических питательных веществ. Один рацион представлял собой рацион с высокой производительностью (HPF), характеризующийся низким содержанием углеводов/высоким содержанием белка и жира (29:39:19 % в корме), а другой — рацион для нормального содержания (LPF), характеризующийся высоким содержанием углеводов/низким содержанием белка и жира (50:24:12 % в корме). Исследование длилось 84 дня. В дни 0, 28, 56 и 84, за 180 мин до тренировочной работы (T0), сразу после нее (T1) и через 120 мин (T2) в крови определяли уровень адренокортикотропного гормона (АКТГ), кортизола, d-ROMS (соединения, являющиеся производными метаболитов реактивного кислорода) и ВАР (биологический антиоксидантный потенциал). Лактат измеряли в моменты T0 и T1. Статистическая модель включала эффекты диеты (HPF против LPF), времени (от дня 0 до дня 84, конец исследования), физической нагрузки (T0, T1 и T2) и их взаимодействие. АКТГ ($P = 0,002$) и кортизол ($P = 0,013$) имели более высокие значения в группе HPF, чем в группе LPF; для лактата существенных различий не наблюдалось. Время не выявило существенных различий ни для гормонов, ни для лактата в крови. Физическая нагрузка значительно ($P < 0,001$) повлияла на концентрацию АКТГ и кортизола, показав более высокие значения в T1 по сравнению с T0 и T2, а лактат был выше ($P < 0,0001$) в T1 по сравнению с T0. Диета не влияла на биомаркеры окислительного стресса. Время значительно ($P < 0,05$) повлияло на результаты ВАР, но не на d-ROM. Упражнения не влияли на результаты ВАР, но d-ROM были выше в T0, чем в T2 ($P = 0,001$). Эффект взаимодействия отсутствовал. Реакция гипофизарно-надпочечниковой оси (ГН) и индексы окислительного стресса могут представлять собой объективный метод определения оптимальных диетических протоколов для подготовки успешной собаки-поводыря в ранний период обучения.

Ключевые слова: собака-поводырь, диета, тренировка, гормональный биомаркер, оксидативный показатель

Effects of dietary protein and fat concentrations on hormonal and oxidative blood stress biomarkers in guide dogs during training

B. Chiofalo¹, E. Fazio¹, P. Lombardi², S. Cucinotta¹, V. Mastellone², A.R. Di Rosa¹, C. Cravana¹

¹Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Polo Universitario Annunziata (Messina, Italy).

²Department of Veterinary Medicine and Animal Production, University of Napoli Federico II (Napoli, Italy).

We compared the effects of different feeding strategies on hormonal and oxidative stress biomarkers in guide dogs during specialized training programs. Eight neutered adult dogs belonging to the Labrador retriever breed were divided during the training work into two homogeneous groups for sex (2 males, 2 females), age (17 months ± 1), initial body weight (26.3 kg ± 1), and BCS (4.5 of 9 ± 0.11) and fed two commercial diets with different concentration of energetic nutrients. One diet was a performance diet (HPF) characterized by low-carbohydrate/high-protein and fat content (29:39:19% as-fed) and the other a normal maintenance diet (LPF), characterized by high-carbohydrate/low-protein and fat content (50:24:12% as-fed). The trial lasted 84 days. At days 0, 28, 56, and 84, 180 min before the training work (T0) and immediately after (T1) and after 120 min (T2), blood adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol, d-ROMS (reactive oxygen metabolites-derived compounds), and BAP (biological antioxidant potential) were evaluated. Lactate was measured at T0 and T1. The statistical model included the effects of diet (HPF vs. LPF), time (from day 0 to day 84, end of the trial), and exercise (T0, T1, and T2) and their interaction. ACTH ($P = 0.002$) and cortisol ($P = 0.013$) showed higher values in the HPF than in the LPF group; there were no significant differences observed for lactate. Time showed no significant difference for any hormones or blood lactate. Exercise significantly ($P < 0.001$) influenced ACTH and cortisol concentrations, showing higher values at T1 than T0 and T2, and with lactate higher ($P < 0.0001$) at T1 than T0. Diet did not influence biomarkers of oxidative stress. Time did significantly ($P < 0.05$) influence BAP results but not d-ROMs. Exercise had no effect on BAP results, but d-ROMs were higher at T0 than T2 ($P = 0.001$). There was no interaction effect. The pituitary-adrenal (HPA) axis response and the oxidative stress indices could represent an objective method to identify optimal dietary protocols for creating a successful guide dog during the early training period.

Keywords: guide dog, diet, training, stress, hormonal biomarker, oxidative index.

Сокращения: АКТГ — адренокортикотропный гормон, ВАР (БАП) — biological antioxidant potential (биологический антиоксидантный потенциал), ГН-ось — гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, ОСТ — оценка состояния тела, РМК — реактивные метаболиты кислорода, РФК — реактивные формы кислорода, СПС — собаки-поводыри для слепых, НРФ — high-protein and fat (высокое содержание белка и жира — рацион с высокой производительностью), LRF — low-protein and fat (низкое содержание белка и жира — рацион для нормального содержания).

Введение

Собаки-поводыри для слепых (СПС) играют важную роль в обществе, обеспечивая независимое передвижение людей с нарушениями зрения. Их услуги стоят дорого из-за ресурсов, выделяемых на содержание, уход и обучение, необходимых для подготовки таких животных. Успешность обучения собак варьируется от 50 до 56 % (Ennik et al., 2006), что приводит к большим производственным затратам.

План питания, подходящий для животных, обучаемых в качестве проводников для слепых людей, представляет собой лишь малую часть денежных вложений, поскольку он должен учитывать не только работу по дрессировке животных, которая увеличивает потребности в питательных веществах и энергии, но и метаболические нарушения, вызванные стрессом в результате изменения образа жизни (работа и условия содержания), что может привести к ухудшению здоровья и самочувствия.

Исследования, связанные с оптимальными схемами кормления собак-спортсменов, ведутся с начала 1930-х годов, и значительные успехи были достигнуты в кормлении собак, выступающих на выносливость (Hill, 1998; Toll et al., 2010; Wakshlag et al., 2014). Ober et al. (2016) отметили, что у рабочих лабрадоров, получавших полноценный и сбалансированный рацион с высоким содержанием белков и жиров, статистически и физиологически значимо снижалась концентрация кортизола в сыворотке крови, что является основой для снижения метаболического стресса. По другим данным, упражнения и программа тренировок также могут представлять собой стресс-фактор, способный вызвать эндокринные и метаболические изменения у собак-поводырей (Mizukoshi et al., 2008; Tomkins et al., 2011), собак в соревнованиях по аджилити (Pastore et al., 2011), ездовых собак (Angle et al., 2009), а также поисково-спасательных собак (Vassallotti et al., 2017). Другие причины могут быть связаны с возможным изменением уровня лактата в крови в зависимости от программы тренировок и соответствующих временных точек. Концентрация лактата, метаболита, образующегося в результате анаэробных процессов, служит показателем физической формы

и уровня тренированности, а также окислительной способности (Billat et al., 2003). Окислительное повреждение, вызванное физическими упражнениями, было зарегистрировано у собак (Baskin et al., 2000; Piercy et al., 2000). Было показано, что физические упражнения и программы тренировок увеличивают выработку РФК до такой степени, что они могут превысить уровень антиоксидантной защиты и вызвать окислительный стресс (Alessio et al., 2000; Watson et al., 2005), увеличить мышечную усталость и повреждение мышечных волокон (Powers and Jackson, 2008), и в конечном итоге привести к нарушению иммунной системы (Gleeson, 2007). Количественное определение РФК на практике затруднено (Sechi et al., 2017); из-за своей высокой реакционной способности РФК реагируют практически со всеми органическими молекулами, с которыми они встречаются, образуя РМК, которые более стабильны, чем РФК, и поэтому легче поддаются количественному определению. Напротив, БАП соответствует общей антиоксидантной способности плазмы крови и включает в себя экзогенные или эндогенные компоненты, которые могут противостоять окислительному действию реактивных видов (Benzie and Strain, 1996). По этим причинам при лабораторной оценке оксидативного статуса необходимо учитывать как прооксидантную, так и антиоксидантную составляющие (Alberti et al., 2000).

Диетические манипуляции могут ограничить вызванное физической нагрузкой повреждение мышц у собак-спортсменов (Baskin et al., 2000; Hinchcliff et al., 2000; Piercy et al., 2000). Очень немногие исследования использовали биомаркеры стресса в крови животных во время тренировок, чтобы предсказать их пригодность в качестве поводырей для слепых.

Гипотеза заключалась в том, что реакция ГН-оси и показатели окислительного стресса могут представлять собой объективный метод для определения оптимального протокола питания для успешной собаки-поводыря в ранний период обучения.

Цель исследования

Сравнить влияние различных стратегий питания на гормональные показатели и биомаркеры оксидативного стресса у собак-проводников во время специализированных программ обучения.

Материалы и методы

Оперативные процедуры и уход за животными проводились в соответствии с рекомендациями по надлежащей клинической практике (ЕМЕА, 2000) и международными нормами (Директива 2010/63/EU). На основании статьи 2 итальянского законодательного декрета 26/2014 исследование получило институциональное одобрение Комитета по этическому уходу и использованию животных при факультете

ветеринарии Мессинского университета 19 октября 2016 года, Codex 006/2016 bis.

Животные и рацион питания. Исследование проводилось на восьми кастрированных взрослых собаках породы лабрадор-ретривер, клинически здоровых, содержащихся в Региональном центре Хелен Келлер Итальянского союза школ слепых и собак-поводырей в Мессине (Италия). Этот центр является уникальным в Италии. Он является членом Международной федерации собак-поводырей (IGDF) и, соответственно, аккредитован в соответствии с самыми высокими международными стандартами. В основном в центре содержатся собаки породы лабрадор-ретривер, отличающиеся миролюбивым нравом и врожденным чувством направления, а также золотистые ретриверы и немецкие овчарки.

Собаки, принятые в исследование, были разделены на две однородные группы по полу (2 самца, 2 самки), возрасту (17 месяцев ± 1), начальной массе тела (26,3 кг ± 1) и BCS (4,5 ± 0,11). Первая группа, названная группой HPF, получала «высокопродуктивную» диету, характеризующуюся низкоуглеводной/высокобелковой и жировой диетой (29:39:19 %), в то время как вторая группа, названная группой LPF, получала «нормальную поддерживающую» диету, характеризующуюся высокоуглеводной/низкобелковой и жировой диетой (50:24:12 %).

Собак размещали индивидуально в загонах площадью шесть квадратных метров, примыкающих к большому открытому пространству, куда они имели доступ во время отдыха, а пищу давали два раза в день в индивидуальной миске.

Испытаниям предшествовал 7-дневный период адаптации к экспериментальному рациону. В период адаптации количество вводимого рациона было таким же, как и ранее принятое заводчиком.

Для испытаний использовали три партии корма. Каждая партия была отобрана и проанализирована отдельно, как описано у Chiofalo et al. (2019a).

Оба экспериментальных рациона, предоставленные Farmina Pet Foods, содержали баранину в качестве основного источника белка и качественно одинаковые ингредиенты, химический состав, пищевые добавки и антиоксиданты (токоферолсодержащие экстракты природного происхождения). Информация по химическому составу рационов HPF и LPF представлена в таблице 1.

Количество корма, ежедневно вводимого каждой собаке, рассчитывалось исходя из соотношения между расчетными потребностями в метаболизируемой энергии, предложенными Hand et al. (2010) для собак, выполняющих работу, характеризующуюся умеренной продолжительностью и частотой:

$$DER = 2 \times RER (70 \text{ Ккал} \cdot BW^{0,75})$$

где DER — суточная потребность в энергии, RER — потребность в энергии в состоянии покоя, а калорийность метаболизируемой энергии (ME) указана на этикетке (NRC, 2006) каждого рациона (HPF и LPF).

Чтобы соблюсти пищевые потребности собак, каждого испытуемого кормили для поддержания кондиции тела в пределах 4 или 5 баллов из 9 и для поддержания массы тела с начала, и до конца исследования, при этом потребление калорий никогда не изменялось более чем на ±15 % от потребления калорий в начале исследования. Массу тела собак регистрировали каждую неделю, у голодных животных, в 8:00 с помощью цифровых весов. Рацион корректировался таким образом, чтобы собаки не теряли и не набирали более 5 % массы тела.

Протокол обучения. Все собаки были обучены и подготовлены к работе по программе дрессировки за месяц до начала исследования. Все собаки были в возрасте от 1 до 2 лет и были тренированы по программе обучения для работы в качестве собак-поводырей в районе, описанном ниже (см. параграф Программа тренировок), и питались обычным рационом (см. параграф Животные и рацион). Протоколы обучения и тренировки оставались одинаковыми для всех собак

1 Химический состав и метаболизируемая энергия рационов, которые давали собакам до и во время исследований^a

Chemical composition and metabolizable energy of the diets administered to dogs before and during the trial^a

Рацион	Неизвестный ^b		HPF ^c		LPF ^c	
	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO
Влажность, г/100г	9,0	НД	5,42	0,48	6,12	0,57
Сырой белок, г/100г	26	НД	39,24	0,84	24,4	0,32
Жир, г/100г	15,50	НД	18,69	0,51	11,78	0,29
Органическое в-во, г/100г	НД	НД	86,83	0,27	86,5	1,2
Общая клетчатка, г/100г	2,8	НД	11,59	1,13	13,03	1,46
Зола, г/100г	4,9	НД	7,91	0,23	7,51	0,55
Метаболизируемая энергия, кДж/100г	1633	НД	1813	НД	1433	НД

^a Указаны средние значения ± стандартное отклонение (CO).

^b Значения взяты с этикетки.

^c Значения определены аналитическим путем.

во время диетических испытаний, каждое из которых длилось 12 недель. Таким образом, каждая собака выполняла роль собственного контроля во время исследования. Кроме того, собаки были привычны к взятию крови; перед началом испытаний были проведены гематологические (общеклинический и биохимический) анализы каждого испытуемого, чтобы оценить состояние его здоровья. Перед началом испытаний все собаки прошли физический осмотр для оценки их клинического состояния (Ciaramella, 2014).

Программа тренировок. Метод набора участников описан в исследовании Lloyd et al. (2008).

Дрессировка состояла из различных фаз, в ходе которых собака постепенно все больше осваивала работу проводника. Она включала в себя ведение человека по прямой, остановку при любом изменении высоты местности, а также преодоление препятствий и обход препятствий. В программе обучения собак-поводырей для слепых в качестве эффективного инструмента мотивации и закрепления желаемого поведения использовалось пищевое вознаграждение. Во время каждой тренировки (в день 0, день 28, день 56 и день 84) собак знакомили с определенными поведенческими навыками:

- остановка на улице, независимо от типа бордюра или пандуса для инвалидных колясок;
- проверка пространства вокруг дрессировщика с правой и левой стороны, а также над головой собаки;
- пересечение улиц по линии, которая эффективно достигает бордюра на другой стороне;
- поддержание постоянного темпа и динамики с помощью словесной команды «прямо»;
- реагирование на различные варианты использования словесного сигнала «вперед» для возобновления или увеличения темпа, приближения к точке остановки или перефокусировки;
- остановка и спокойное стояние после словесной команды «стоп»;
- ведение хендлера на 90 градусов вправо и выбор новой линии движения на «право»;
- ведение дрессировщика на 90 градусов влево и выбор новой линии движения на «лево».

Собаки-поводыри для слепых тренировались каждый день. Каждая тренировка начиналась в 11:00 утра и заканчивалась в 12:00 дня (Chiofalo et al., 2019a).

Физическое обследование. Для оценки показателей исследуемых собак, начиная с 0-го дня (начало введения нового корма) и по 84-й день, все собаки еженедельно проходили физический осмотр (Ciaramella, 2014), включая оценку психики/уровня сознания, осанки и походки, уровня гидратации, ректальной температуры (°C), частоты пульса, частоты и характера дыхания, показателей перфузии.

Измерение концентрации гормонов и лактата. Для оценки гормональных изменений у собак ежемесячно (день 0, день 28, день 56 и день 84) брали

образцы крови за 180 мин до начала тренировки (8:00 утра), сразу по окончании тренировки (T1 в 12:00 дня) и через 120 мин после окончания тренировки (T2 в 14:00 дня).

Перед началом испытаний собак приучали к процедуре взятия крови (см. пункт «Протокол обучения»). Все образцы собирались в одинаковые вакуумированные пробирки и немедленно охлаждались при температуре 4°C. Первые образцы впоследствии (в течение 1 ч) центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g, а вторые образцы использовали для оценки гематологических параметров. Все образцы сыворотки были собраны и хранились при температуре 20 °C до проведения анализа. Концентрацию АКТГ в плазме и кортизола в сыворотке крови определяли в двух экземплярах с помощью флуоресцентного иммуноферментного анализатора Tosoh Bioscience (ТВ), Бельгия-Япония (AIA 360), валидированного для использования у собак (Scott-Moncrieff et al., 2003; Higgs et al., 2014). В этом анализаторе используется конкурентный флуоресцентный иммуноферментный анализ, который проводится полностью в небольших одноразовых тест-стаканчиках, содержащих все необходимые реагенты. Аналит, присутствующий в образце, конкурирует с меченым ферментом гормоном за ограниченное количество мест связывания на гормон-специфических антителах, иммобилизованных на магнитных шариках. Шарик промывают, чтобы удалить несвязанный меченый ферментом гормон, а затем инкубируют с флуорогенным субстратом, 4-метилумбеллиферилфосфатом (4MUP). Количество гормона, меченого ферментом, которое связывается с шариками, обратно пропорционально концентрации гормона в исследуемом образце. Процедуры калибровки, ежедневной проверки и технического обслуживания выполнялись в соответствии с руководством по эксплуатации системы. Коэффициенты вариации внутри анализа и между анализами для концентраций кортизола и АКТГ составили 7 % и 15 %, соответственно. Для оценки тренировочной нагрузки собак измеряли концентрацию лактата в крови за 180 мин до (T0) и сразу после (T1) тренировки с помощью тестера Accusport.

Измерение показателей окислительного стресса. Для измерения окислительного стресса с помощью спектрофотометрических тестов d-ROMs (соединения, являющиеся производными метаболитов реактивного кислорода) и БАП образцы крови брали ежемесячно в переменное время на 0, 28, 56 и 84-й день перед физической нагрузкой; в переменное время после физической нагрузки — непосредственно до (T0), сразу после (T1) и через 120 мин после нагрузки (T2).

В тесте d-ROMs реактивные кислородные метаболиты (в первую очередь гидроперекиси) в биологическом образце в присутствии железа, высвобождаемого из белков плазмы кислотным буфером, способны генерировать алкоксильные и пероксильные радикалы в соответствии с реакцией Фентона. Такие

радикалы могут окислять алкилзамещенный ароматический амин (N, N-диэтилпарафенилендиамин), в результате чего образуется производное розового цвета, которое фотометрически количественно определяется при 505 нм (Albertiet al., 2000). Концентрация d-ROMs прямо пропорциональна интенсивности окраски и выражается в единицах Каррателли (1 ЕД КАРР = 0,08 мг перекиси водорода/дл). В тесте БАП добавление образца плазмы к окрашенному раствору, полученному путем смешивания раствора хлорида железа с раствором производного тиоцианата, вызывает обесцвечивание, интенсивность которого измеряется фотометрически при 505 нм и пропорциональна способности плазмы восстанавливать ионы железа (Benzie and Strain, 1996). Результаты выражаются в моль/л восстановленных ионов железа. Оба теста были валидированы для собак (Pasquini et al., 2008).

Статистический анализ. Для анализа был выбран дисперсионный анализ смешанной модели (XLSTAT, 2014) с фиксированными эффектами времени (день 0, день 28, день 56 и день 84), диеты (HPF против LPF) и физической нагрузки (T0: 180 мин до тренировки, T1: сразу после тренировки и T2: 120 мин после тренировки). Взаимодействие (диета*время*тренировка) было принудительно включено в каждую модель. Случайными эффектами в модели были отдельные собаки. Результаты исследования были проверены на нормальность, и в каждом случае результаты были нормально распределены. Вычислялись средние значения по методу наименьших квадратов и стандартная ошибка среднего. Сравнение между средними по методу наименьших квадратов проводили с помощью теста Тьюки. Различия считались значимыми при $P < 0,05$.

Результаты

Физический осмотр и масса тела. Во время исследования собаки имели нормальный внешний вид, нормальный уровень сознания, отсутствие отклонений в осанке, адекватный уровень гидратации, ректальную температуру в пределах нормального физиологического диапазона ($38,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,32$). Пульс на бедренной артерии был сильным и находился в пределах нормы для собак ($92 \text{ уд/мин} \pm 14$)

(Ciaramella, 2014). Средняя частота дыхания, определяемая визуально или с помощью аускультации как количество вдохов и выдохов, находилась в пределах нормальных физиологических значений ($18 \pm 29 \pm 3$) (Ciaramella, 2014). Цвет слизистой оболочки был розовым, а время наполнения капилляров составляло менее 2 с. Диета повлияла на показатели животных в связи с различным содержанием белков, жиров и углеводов, показав значительно большую ($P < 0,001$) массу тела в группе HPF, чем в группе LPF (25,40 против 23,44 кг).

Гормональный ответ. Средние значения концентрации АКТГ ($P = 0,002$) и кортизола ($P = 0,013$) были выше (табл. 2) в группе LPF по сравнению с группой HPF. В то же время гормональный ответ не зависел от времени (табл. 3), концентрации АКТГ ($P = 0,607$) и кортизола ($P = 0,326$). На концентрацию АКТГ и кортизола значительно повлияла физическая нагрузка (табл. 4). Значения P-values для концентраций АКТГ и кортизола были парными и составляли $P < 0,0001$. Средние значения концентрации АКТГ в плазме крови при T1 были выше ($P < 0,01$), чем при T0 и T2. Более высокие значения кортизола наблюдались при T1 по сравнению с T2 ($P = 0,02$) и T0 ($P < 0,01$).

Взаимосвязь диета*время*упражнения не выявила существенных различий для концентраций АКТГ ($P = 0,745$) и кортизола ($P = 0,381$).

Лактат. Для лактата не наблюдалось значимых различий в зависимости от диеты ($P = 0,776$; см. табл. 2) и времени ($P = 0,696$; см. табл. 3). Тренировка (табл. 4) значительно повлияла на концентрацию лактата в крови в течение всего периода исследования, причем средние значения в точке T1 (сразу после тренировки) были выше ($P < 0,001$), чем в точке T0 (до тренировки). Взаимосвязь диета*время*тренировка не выявила значимых ($P = 0,995$) различий для концентрации лактата в крови.

БАП и тест d-ROM. Рацион питания (см. табл. 2) не оказал влияния ни на один из окислительных биомаркеров (БАП [$P = 0,092$]; d-ROM [$P = 0,321$]).

Значительные ($P = 0,02$) различия наблюдались в зависимости от переменной времени (см. табл. 3) для теста БАП: средние значения в день 0 ($P = 0,011$) и день 84 ($P = 0,033$) были значительно выше, чем в день 56. Тест d-ROM не показал значительных ($P = 0,062$) различий в зависимости от времени.

2. Влияние диеты на гормональные и окислительные биомаркеры стресса в крови в ходе исследования^c Effect of the diet on hormonal and oxidative blood stress biomarkers in the trial^c

Группа	АКТГ, пг/мл		Кортизол, мкг/дл		Тест БАП, мкмоль/л		Тест d-ROMs, CARR U		Лактат, нмоль/л	
	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС
HPF	30,25 ^b	1,11	2,24 ^b	0,12	3099	101	83,47	2,88	1,78	0,16
LPF	33,06 ^a	1,22	2,51 ^a	0,17	2825	123	88,04	3,53	1,74	1,15

^{a, b} Значения в одном столбце с разными надстрочными знаками указывают на достоверность различий при $P < 0,05$, используя тест Тьюки.

^c Значения даны как СНК — среднее наименьшее квадратичное \pm СОС — стандартная ошибка среднего

3. Влияние времени на гормональные и оксидативные биомаркеры стресса в крови в ходе исследования^c Effect of the time on hormonal and oxidative blood stress biomarkers in the trial^c

Время ^d , день	АКТГ, пг/мл		Кортизол, мкг/дл		Тест БАП, мкмоль/л		Тест d-ROMs, CARR U		Лактат, нмоль/л	
	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС
0	31,8	3,71	2,41	0,2	3243 ^a	158	90,75	4,52	1,80	0,21
28	35,47	3,0	2,46	0,22	2937 ^{ab}	158	91,26	4,52	1,69	0,28
56	33,12	3,06	2,31	0,18	2520 ^b	158	71,13	4,52	1,85	0,22
84	33,41	3,07	2,2	0,21	3149 ^a	158	85,89	4,51	1,68	0,19

^{a, b} Значения в одном столбце с разными надстрочными знаками указывают на достоверность различий при $P < 0,05$, используя тест Тьюки.

^c Значения даны как СНК — среднее наименьшее квадратичное \pm СОС — стандартная ошибка среднего

^d Время = забор крови в день 0, день 28, день 56 и день 84, до начала тренировки.

4. Влияние физических упражнений на гормональные и оксидативные биомаркеры стресса в крови в ходе исследования^c Effect of the exercise on hormonal and oxidative blood stress biomarkers in the trial^c

Нагрузка ^d	АКТГ, пг/мл		Кортизол, мкг/дл		Тест БАП, мкмоль/л		Тест d-ROMs, CARR U		Лактат ^e , нмоль/л	
	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС	СНК	СОС
T0	23,21 ^b	1,24	1,62	0,08	3019	137	96,69	3,92	1,06	0,36
T1	47,95 ^a	2,07	3,2	0,11	3011	137	85,77	3,92	2,45	0,29
T2	29,19 ^b	1,71	2,22	0,09	2856	137	74,8	3,92	НД	НД

^{a, b} Значения в одном столбце с разными надстрочными знаками указывают на достоверность различий при $P < 0,05$, используя тест Тьюки.

^c Значения даны как СНК – среднее наименьшее квадратичное \pm СОС – стандартная ошибка среднего

^d Нагрузка = взятие крови непосредственно до (T0), сразу после (T1) и через 120 мин (T2) после физической нагрузки.

^e ND: не выполнялось, поскольку концентрация лактата в крови восстанавливается до исходных значений в течение 60 мин.

Что касается переменной тренировки (см. табл. 4), то для БАП не наблюдалось значительных ($P = 0,808$) различий, в то время как d-ROM показал значительно ($P = 0,001$) более высокое значение до тренировки (T0), чем через 120 мин после тренировки (T2).

Взаимосвязь диета*время*упражнения во время испытания не выявила значительных различий для ВАР ($P = 0,492$), а также для теста d-ROM ($P = 0,350$).

Обсуждение

Рацион для собаки в периоды нормального содержания (PG = 20...23 %; LG = 10...12 %) не соответствует требованиям во время тренировочной работы. Использование большого количества корма не рекомендуется. Употребление диеты «Performance», характеризующейся низким содержанием углеводов/высоким содержанием белков и жиров (29:39: 19 %) кажется более подходящим для легких продолжительных тренировок, чем употребление обычной поддерживающей диеты, богатой углеводами (Chiofalo et al., 2019b). Эта диета ограничила потерю массы тела в группе HPF, как это наблюдалось у собак группы LPF (- 18 %). Тем не менее, все животные во время испытания потеряли массу; это может быть связано с тренировочной работой служебных псов для слепых. Потеря массы является нормой для собак-поводырей во время обучения, в соответствии с физическими нагрузками и

жизнью в питомнике (Chiofalo et al., 2019a). Более того, учитывая, что лабрадоры-ретриверы могут быть генетически предрасположены к ожирению и остеоартикулярным заболеваниям (Raffan et al., 2016), и принимая во внимание важную роль СПС, они должны поддерживать умеренную массу тела во время программы тренировок.

Концентрация АКТГ, кортизола (Kaneko et al., 2010; Larsson et al., 2015) и лактата крови (Kaneko et al., 2010; Fazio et al., 2015; Ober et al., 2016) соответствовала физиологическим диапазонам, указанным в литературе. Небольшие колебания могут быть объяснены различиями между лабораториями, использующими разные методы и приборы, и являются предметом дискуссий. Некоторые различия также могут быть объяснены различными экспериментальными тренировочными программами, интенсивностью и тяжестью нагрузки и/или тренировочным статусом (Rovira et al., 2008), а также разным содержанием рационов питания (Larsson et al., 2015; Ober et al., 2016).

Значительные изменения в энергетическом метаболизме происходят во время тренировки и сохраняются в течение нескольких часов после нее, выявляя проблемы энергетического гомеостаза. Физические упражнения соответствуют модели стресса, за которым следуют некоторые эндокринные изменения, чтобы уравновесить его влияние на термогенез и субстратный метаболизм (Mastorakos and Pavlatou, 2005). В каждый из моментов взятия

проб мягкие стрессоры, как положительные, так и отрицательные, могут быть невероятно полезны для тренировок. Фактически, сам процесс дрессировки является легким стрессом для собак. Методы дрессировки, основанные на вознаграждении, способствуют развитию положительного стресса, также известного как «эустресс», который побуждает к самосовершенствованию.

Концентрация гормонов НРА различалась в группах HPF и LPF. Эти данные согласуются с результатами других исследований, указывающих на то, что повышенное содержание белков и жиров в рационе может снизить реакцию НРА на хронические стрессоры у животных (Hennessy et al., 2002). Тем не менее, неясно, связано ли это со стресс-редуцирующим влиянием или с более прямым метаболическим эффектом различных диет.

Реакция оси ГГН связана с широким спектром возбуждающих или аверсивных и угрожающих событий, но активация ГГН не обязательно отражается на поведении. Хотя поведенческие признаки стресса часто положительно коррелируют с показателями активности ГГН, также возможно, что концентрация гормонов повышена, в то время как животные выглядят спокойными (Helmerich et al., 2012), или что поведение и кортизол могут быть не связаны с реакцией на стресс (Elder and Menzel, 2001).

В данном исследовании, не собрав поведенческих данных, мы не смогли отличить эмоциональный компонент от физических нагрузок для СПС в течение всего периода обучения. Хилл и др. (2009) сообщили, что низкоуглеводная/высокобелковая и жировая диета может быть полезна для служебных собак, поскольку она не только ближе к диете предков (Case, 2005), но и, как оказалось, дает преимущества в работе служебных собак при длительных нагрузках, требующих постоянного источника энергии (Davenport et al., 2001). Кронфельд и др. (1977) считают, что углеводы не являются необходимыми в рационе собак, работающих на выносливость.

Что касается времени, то, хотя эта переменная не влияла на гормональный ответ, концентрация АКГГ и кортизола была немного выше на 28-й день по сравнению с другими днями у всех собак. Эти незначительные различия могут быть связаны с тренировочной работой в первый период этих занятий для всех собак, включающей аэробную активность с низкой потребностью в энергии. Тренировочное упражнение явно стимулировало выброс АКГГ и связанное с этим последовательное увеличение концентрации циркулирующего кортизола, в основном сразу после тренировки, как в группах HPF, так и LPF. Эти повышения подтвердили, что тренировочный стресс вызывает увеличение скорости метаболизма и расхода энергии через активацию оси ГГН (Sapolsky et al., 2000). Повышение активности оси ГГН в ответ на широкий спектр угрожающих, возбуждающих или неприятных событий и амплитуда гормонального ответа могут коррелировать с тяжестью, предсказуемостью и контролем стимула

(Beerda et al., 1998; Fazio et al., 2015), как показали данные, наблюдаемые в ходе общей тренировочной программы.

Более того, физиологический диапазон кортизола, наблюдаемый через 120 мин после тренировки, согласуется с последними данными, показывающими, разрешает ли действие глюкокортикоидов, стимулирует или подавляет текущую стресс-реакцию (Sapolsky et al., 2000). Данные пытаются объединить эти разнородные действия глюкокортикоидов в физиологическое целое, как ранее отмечали Sapolsky et al. (2000).

Самая высокая концентрация лактата в крови, наблюдаемая на Т1 каждой тренировочной недели, может быть обусловлена, во-первых, наложением эффектов тренировочной нагрузки и метаболического результата, как и ожидалось у нетренированных молодых собак; во-вторых, она может быть объяснена на основе начальной и, соответственно, интенсивной активности этих субъектов, в связи с доступом к открытой площадке, независимо от интенсивности и продолжительности, что подтверждает предыдущие данные, полученные после стандартизированных упражнений на беговой дорожке (Ober et al., 2016). Возможно, что начальная тренировочная активность у молодых собак вызывала значительное утомление, наступающее после завершения тренировочной программы, в соответствии с последовательным потреблением и расходом запасов O₂ (Billat et al., 2003).

Результаты теста БАП согласуются с данными, полученными Dohi et al. (2005) на собаках, и немного превышают референтный диапазон (2069...2554 ммоль/л), подтвержденный Pasquini et al. (2008) у собак. Данные по тесту d-ROMs соответствуют результатам, полученным Iamele et al. (2002) и Trotti et al. (2002) на выборке собак (от 56,4 до 91,4 CARR U) и Pasquini et al. (2008) на собаках (67,1...91,5 CARR U).

Влияние рациона на показатели окислительного стресса (тесты БАП и d-ROMs) не наблюдалось; эти результаты свидетельствуют о сбалансированном содержании основных питательных веществ (витаминов и минералов) в обоих коммерческих рационах и отвечают за общее состояние здоровья собак, учитывая, что БАП соответствует общей антиоксидантной способности плазмы, включая эндогенные (например, белковые) компоненты, которые могут противостоять окислительному действию реактивных видов (Benzie & Strain, 1996). Этот эффект был особенно ощутим для теста БАП в конце испытания (на 84-й день), поэтому через три месяца собаки получили экспериментальный рацион, продемонстрировав хорошую адаптивную реакцию на рацион.

Что касается упражнений, то высокое среднее значение d-ROMs (96,69 CARR U), наблюдаемое непосредственно перед началом упражнения (T0), выше верхнего диапазона (92...95 CARR U), определенного Pasquini et al. (2010) и Sechi et al. (2015) как «порого-

вая граница», может быть связано с возбужденным состоянием собак перед работой. Этот показатель находится в пределах «нормальных» значений (от 50 до 90 CARR U) сразу после тренировки и через 120 мин после нее, что свидетельствует о восстановлении нормального оксидативного статуса (Michailidis et al., 2007) и/или адаптации к нагрузке, которая может снизить оксидативный стресс (Leeuwenburgh and Heinecke, 2001; Watson et al., 2005; Apor and Radi, 2006; Jackson, 2008).

Динамика d-ROMs и БАП не совпадает с данными, полученными Bergero et al. (2004). Эти авторы наблюдали увеличение маркеров окисления и снижение антиоксидантной способности во время тренировок. Противоречивый эффект может быть связан с особенностью тренировок собак-поводырей, которые хоть и подвергаются физической и умственной работе, непрерывной и требовательной, однако физические нагрузки не являются особенно интенсивными. Другое объяснение может заключаться в том, что оксидативный стресс можно сдерживать с помощью хорошей тренировки. По этой причине оценка оксидативного статуса с помощью специфических параметров может стать дешевым, быстрым и практичным методом мониторинга активности служебных собак (Pasquini et al., 2010).

Схожие значения, наблюдаемые в отношении факторов взаимодействия рацион*время*тренировки, могут быть связаны с введением контролируемого и сбалансированного содержания антиоксидантов в обоих рационах, что может стать эффективным подходом к восстановлению хорошего клеточного метаболизма и нейтрализации избытка свободных радикалов у служебных собак (Sechi et al., 2017).

Заключение

Биомаркеры стресса в крови представляют большой интерес в кинологовической спортивной медицине для оценки состояния здоровья и уровня физической подготовки, а также для мониторинга стресса, вызванного физическими нагрузками. В настоящее время существует недостаток информации о физиологическом эффекте умеренных нагрузок у собак, особенно у собак-поводырей.

Результаты исследования массы тела показали, что низкоуглеводная/высокобелковая и жировая диета является наиболее подходящим планом питания для поддержания умеренных физических нагрузок у собак-проводников во время их тренировочной работы, поддержания массы тела и ОСТ, а также стрессовой реакции на тренировку. Диетические факторы могут

снизить реакцию ГГН на хронические стрессоры у СПС, участвующих в программе тренировок. С практической точки зрения, оценка референтных значений и связанных с ними изменений нейроэндокринных и функциональных переменных у лабрадоров-ретриверов в начале программ начальной дрессировки является основным требованием для будущего внедрения надежных маркеров тренировочного статуса и будущей прогрессирующей физической формы. Обеспечение хорошего психического и физического состояния собак, по-видимому, имеет решающее значение не только для благополучия, но и для достижения главной цели — успешной деятельности этих животных.

Значения показателей оксидативного стресса, которые находятся в пределах нормы, могут быть обусловлены хорошей программой дрессировки, которой собаки были подвергнуты в школе проводников, являющейся членом Международной федерации собак-поводырей (IGDF) и, следовательно, аккредитованной по самым высоким международным стандартам.

Программы дрессировки неизбежно связаны с реакцией на стресс, но этого можно избежать благодаря правильному питанию и обращению, а также условиям содержания, учитывающим темперамент лабрадора-ретривера. Повышение концентрации кортизола сразу после упражнения подтверждает, что кортизол является маркером стресса и у собак во время специфической работы проводника. Эти данные свидетельствуют о том, что воздействие программы тренировок может изменить эндокринную реакцию на стресс и тем самым предрасположить к различным показателям в будущем.

Мониторинг биомаркеров стресса в крови во время тренировок в зависимости от диеты, времени и активности может стать эффективным методом заблаговременного выявления потенциально подходящих субъектов, оптимизации диетических протоколов и снижения затрат, связанных с подготовкой собак-поводырей. Тем не менее, дальнейшее исследование оптимальной для собак-поводырей калорийности белков и жиров может быть целесообразным.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Библиографический список,
а также англ. оригинал статьи**
см. 1-s2.0-S1558787820300204-main-2.pdf