

БІОЛОГІЯ

© Грабовський С. С.

УДК 636. 2:612. 176:017

Грабовський С. С.

ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ КРОВІ БУГАЙЦІВ ЗА УМОВ СТРЕСУ

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій

імені С. З. Гжицького (м. Львів)

grbss@ukr.net

Робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Обґрунтування впливу біологічно активних речовин на регуляцію клітинного метаболізму, імунної системи організму тварин і птиці в умовах стресу», № перж. Реєстрації 0114U000788.

Вступ. На специфічний імунітет впливають стреси різного характеру і, зокрема: температурний [5], транспортування [4, 8], сталь [6], гіпертензія [9] тощо. Показники співвідношення лімфоцитів використовують як типовий маркер стресу у жуйних тварин [7, 13], де встановлена кореляція рівнів кортизолу з імунною відповіддю за різних типів нервової систему у худоби.

У модельному експерименті на щурах досліджували вплив імуномодуляторів з екстракту селезінки на функціональну активність Т- і В-клітинної ланок імунітету за умов передзабійного стресу [3]. Встановлено високий вміст поліамінів в екстракті селезінки, отриманого із застосуванням ультразвуку, що дозволило використати цей субстрат як імуномодулятор та антистресор [2, 3].

Відомо, що поліаміни: путресцин, спермін та спермідин, сприяють розвитку відповідної адаптивної імунної реакції та важливу роль відіграють у контролі вро-дженої імунної відповіді у вищих хребетних. Цей ефект поліамінів на клітинній імунній реакції пов'язаний з експресією генів [10, 12].

Джерела літератури недостатньо висвітлюють питання впливу передзабійного (стресового) стану тварин на окремі показники імунітету у великої рогатої худоби і, зокрема бугайців.

Мета дослідження полягала у вивчені впливу біологічно активних речовин екстракту селезінки на показники специфічного імунітету крові бугайців при транспортуванні та перед забоєм, тобто за умов стресу.

Об'єкт і методи дослідження. Дослід тривалістю п'ять днів провели на бугайцях 12-місячного віку української чорно-рябої молочної породи, яких утримували на стандартному раціоні піддослідного господарства смт Комарно Городоцького району Львівської

області. Було сформовано дві групи бугайців (по п'ять тварин у кожній). Екстракт селезінки використовували як біологічно активні речовини у передзабійний період (за п'ять діб до забою). Екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку, наносили на комбікорм аерозольним методом (70° спиртовий розчин об'ємом 0,7 мл/кг). Тваринам контрольної групи таким же чином давали до корму 70° розчин етанолу в аналогічному об'ємі. Контроль за поїданням комбікорму здійснювали щоденно. Бугайці корм пойдали повністю. Забій тварин проводили в обідній час. Кров для досліджень брали з яремної вени перед постановкою бугайців на дослід, до транспортування та перед забоєм після транспортування.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з тваринами здійснювали 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). Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [11].

У цільній крові бугайців визначали відносну кількість Т- і В-лімфоцитів та їх окремих популяцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана в якості маркерів. За кількістю еритроцитів, адсорбованих одним лімфоцитом, судили про ступінь активності лімфоцитів. Визначали відносну кількість загальних (ТЕ-РУЛ – загальні розеткоутворюючі лімфоцити) та активних Т-лімфоцитів (ТА-РУЛ – активні розеткоутворюючі лімфоцити). Для відмивання лімфоцитів використовували забуферений фізіологічний розчин (рН розчину 7,2–7,4 (7,3). Мононуклеарну фракцію клітин виділяли з гепаринізованої крові бугайців. Мазки висушували, фіксували метанолом, фарбували 7–10 хв за Романовським-Гімзом. Мікроскопію мазків робили під імерсією при збільшенні 90 х 7. За кількістю приєднаних еритроцитів лімфоцити

БІОЛОГІЯ

Таблиця 1

Кількість Т- і В-лімфоцитів та їх функціональна активність у крові бугайців перед постановкою на дослід, од. ($M \pm m$; $n=5$)

Показники	Група тварин	
	Дослідна	Контрольна
Т-загальні (ТЕ-РУЛ), %	53,0±1,9	50,4±1,3
недиференційовані (0)	47,0±1,9**	49,6±1,3
низькоавідні (3–5)	33,6±0,5	33,4±1,3
середньоавідні (6–10)	11,8±0,8	11,0±1,0
високоавідні М	7,6±1,3	6,0±3,0
Т-активні (ТА-РУЛ), %	28,2±1,3*	31,4±0,6
недиференційовані (0)	71,8±1,3	68,6±0,5
низькоавідні (3–5)	15,6±0,6	16,6±0,6
середньоавідні (6–10)	9,0±0,7	9,6±1,5
високоавідні М	3,6±1,3	5,2±1,6
Т-хелпери (Th), %	31,6±1,3	30,6±1,3
недиференційовані (0)	68,4±7,2	69,4±1,3
низькоавідні (3–5)	21,0±1,0	21,4±1,3
середньоавідні (6–10)	6,0±0,7	5,0±1,2
високоавідні М	4,6±0,5	4,2±0,8
Т-супресори (Ts), %	21,2±2,4	19,8±1,8
В-лімфоцити, %	40,8±1,3	41,2±2,0
недиференційовані (0)	59,2±1,3	58,8±2,0
низькоавідні (3–5)	31,2±0,8	31,0±1,9
середньоавідні (6–10)	5,4±1,1	7,2±2,0
високоавідні М	4,2±0,8	3,0±1,2

поділяються на: недиференційовані «нульові» (0) — не приєднали жодного; малодиференційовані (низькоавідні або клітини з малою щільністю поверхневих рецепторів) — приєднали 3–5 еритроцитів; середньоавідні субпопуляції — 6–10 еритроцитів; високодиференційовані (високоавідні) — «розетки» з більше як 10 еритроцитами (М — морула).

Теофілінрезистентні лімфоцити (Т-хелпери, Th) — клітини, які несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу M, а теофілінчутливі лімфоцити (Т-супресори, Ts) — до імуноглобулінів класу G. Хелперні — лімфоцити, здатні формувати розетки після їх інкубації з теофіліном — це теофілінрезистентні клітини. Кількість Ts визначали за різницею між кількістю ТЕ-РУЛ та Th.

Визначали відносну кількість В-лімфоцитів, метод ідентифікації яких ґрунтуються на наявності у них мембраних імуноглобулінових рецепторів, що забезпечує приєднання до В-лімфоцитів індикаторних клітин, які на своїй поверхні містять комплемент-антigen-комплекс (ЕАС-РУЛ). Як індикаторні клітини використовували еритроцити барана, сенсibilізований антитілами і комплементом. Для приготування комплемент-антigen-комплексу використовували готову

рідку гемолітичну сироватку (титр 1 : 1200) та готовий сухий комплемент морської свинки [1].

Математичну обробку результатів опрацьовували статистично за допомогою пакету програм Statistica 6.0 і Microsoft Excel for Windows XP. Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати досліджень та обговорення. Аналізуючи дані отриманих результатів досліджень окремих показників імунного статусу організму бугайців перед постановкою на дослід (підготовчий період) (табл. 1), було встановлено вірогідно меншу кількість Т-активних лімфоцитів (ТА-РУЛ) — на 10% ($P < 0,05$) та недиференційованих або «нульових» Т-загальних лімфоцитів (ТЕ-РУЛ) — на 5% ($P < 0,01$) у бугайців дослідної групи порівняно з тваринами контрольної групи. Усі інші показники специфічного імунітету бугайців у цей період були практично на однаковому рівні та в межах фізіологічної норми.

Як видно з даних, наведених у таблиці 2, загальна кількість Т-хелперів у крові бугайців перед транспортуванням перебувала на однаковому рівні, як у дослідній, так і контрольній групах. До транспортування встановлено вірогідно більшу кількість Т-хелперів з низькою щільністю рецепторів, тобто низькоавідніх (3–5) Т-хелперних лімфоцитів на 18% ($P < 0,05$) та

Таблиця 2
Кількість Т- і В-лімфоцитів та їх функціональна активність у крові бугайців перед транспортуванням, од. ($M \pm m$; $n=5$)

Показники	Група тварин	
	I Дослідна	Контрольна
Т-загальні (ТЕ-РУЛ), %	48,2±4,3	46,4±4,5
недиференційовані (0)	51,8±4,3	53,6±4,5
низькоавідні (3–5)	25,0±10,2	24,2±8,1
середньоавідні (6–10)	12,8±1,1	11,4±3,1
високоавідні М	10,4±6,3	10,8±2,6
Т-активні (ТА-РУЛ), %	29,8±3,9	28,2±2,7
недиференційовані (0)	70,2±3,9	71,8±2,7
низькоавідні (3–5)	16,4±1,8	14,2±0,5
середньоавідні (6–10)	7,0±0,7	8,4±3,2
високоавідні М	6,4±2,6	5,6±1,3
Т-хелпери (Th), %	28,2±0,8	28,0±1,9
недиференційовані (0)	71,2±0,8	72,0±1,9
низькоавідні (3–5)	22,6±0,9*	19,2±0,5
середньоавідні (6–10)	5,0±1,2**	6,8±0,8
високоавідні М	1,2±0,5	2,0±1,0
Т-супресори (Ts), %	20,0±1,9*	18,4±2,1
В-лімфоцити, %	42,6±2,9	41,4±1,5
недиференційовані (0)	57,4±2,9	58,6±1,5
низькоавідні (3–5)	28,2±2,3	26,4±1,3
середньоавідні (6–10)	9,4±2,8	11,0±4,6
високоавідні М	5,0±2,1	4,0±2,0

Таблиця 3

**Кількість Т- і В-лімфоцитів та їх
функціональна активність у крові бугайців,
після транспортування перед забоєм,
од. ($M \pm m$; $n=5$)**

Показники	Група тварин	
	I Дослідна	Контрольна
Т-загальні (ТЕ-РУЛ), %	50,4±1,2*	47,2±1,8
недиференційовані (0)	49,6±3,2	52,8±3,8
низькоавідні (3–5)	27,6±1,6*	24,8±1,1
середньоавідні (6–10)	14,8±1,8	15,2±1,1
високоавідні М	8,0±1,2	7,2±3,8
Т-активні (ТА-РУЛ), %	28,8±3,6	28,0±3,0
недиференційовані (0)	71,2±3,6	72,0±3,0
низькоавідні (3–5)	16,8±1,5	17,6±1,3
середньоавідні (6–10)	7,8±1,8	6,2±1,1
високоавідні М	4,2±2,3	4,2±1,1
Т-хелпери (Th), %	31,8±0,7*	29,0±0,9
недиференційовані (0)	68,2±3,5	71,0±3,7
низькоавідні (3–5)	19,2±3,4	18,8±2,0
середньоавідні (6–10)	7,8±2,7	6,6±2,1
високоавідні М	4,8±1,8	3,6±0,5
Т-супресори (Ts), %	18,6±6,1	18,2±7,5
В-лімфоцити, %	42,4±1,5	42,2±2,2
недиференційовані (0)	57,6±1,5	57,8±2,2
низькоавідні (3–5)	30,8±1,1	32,0±2,0
середньоавідні (6–10)	9,2±0,4	8,4±3,1
високоавідні М	2,4±0,5	1,8±0,8

меншу кількість з середньою щільністю поверхневих рецепторів, тобто середньоавідніх (6–10) – на 26% ($P<0,01$) у крові бугайців дослідної групи порівняно з контролем. Також встановлено більшу відносну кількість Т-супресорів на 9% ($P<0,05$) у крові бугайців, які отримували екстракт селезінки з використанням ультразвуку.

Щодо кількості Т- і В-лімфоцитів та їх функціональної активності у крові бугайців після транспортування та безпосередньо перед забоєм (табл. 3), то всі досліджувані параметри Т- і В-клітинного імунітету були в межах фізіологічної норми.

Ми спостерігали вірогідно більшу кількість ТЕ-РУЛ на 7% ($P<0,05$) та Т-хелперів – на 11% ($P<0,05$) відносно загальної кількості Т-лімфоцитів у бугайців дослідної групи порівняно з тваринами контрольної групи. Кількість Т-загальних низькоавідніх (3–5) клітин теж була більша на – 10% ($P<0,05$) у тварин, яким до корму вносили екстракт селезінки. Отримані дані можуть вказувати на стимулювальний вплив біологічно активних речовин екстракту селезінки – поліамінів, на кількість та функціональну активність показників специфічного імунітету бугайців.

Висновки. Застосування біологічно активних речовин екстракту селезінки бугайцям нівелює передзабійний стрес та підвищує резистентність їх організму.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується дослідити вплив біологічно активних речовин екстракту селезінки на білкові фракції плазми крові бугайців за умов передзабійного стресу.

Література

- Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. – Львів : Сполом, 2012. – 764 с.
- Грабовский С. С. Экстрагирование биологически активных веществ селезенки с использованием ультразвука / С. С. Грабовский // Сборник научных трудов SWORLD. -- Иваново : МАРКОВА АД, 2013. – Вып. 4, Т. 49. – С. 3–6.
- Грабовський С. С. Вплив імуномодуляторів природного походження на показники клітинного імунітету і рівень кортизолу в крові шурів за умов стресу / С. С. Грабовський // Біологічні студії. – 2014. – Т. 8, № 1. – С. 93–102.
- Effects of space allowance during transport and duration of mid-journey lairage period on the physiological, behavioural and immunological responses of young calves during and after transport / P. N. Grigor, M. S. Cockram, W. B. Steele [et al.] // Anim. Sci. – 2001. – Vol. 73. – P. 341–360.
- Natural variations in the stress and acute phase responses of cattle / H. D. Hughes, J. A. Carroll, N. C. B. Sanchez, J. T. Richeson // Innate immunity. – 2013. – P. 888. – DOI: 10.1177/1753425913508993.
- Sexually dimorphic stress and pro-inflammatory cytokine responses to an intravenous corticotropin-releasing hormone challenge of Brahman cattle following transportation / L. E. Hulbert, J. A. Carroll, M. A. Ballou [et al.] // Innate immunity. – 2013. – Vol. 19, Is. 4. – P. 378–387. doi: 10.1177/1753425912462752.
- Flooring and driving conditions during road transport influence the behavioural expression of cattle / C. A. Stockman, T. Collins, A. L. Barnes [et al.] // Applied Animal Behaviour Science. – 2013. – Vol. 143, Is. 1. – P. 18–30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2012.11.003>
- Behavioural research and its application to livestock transport and policy: A European perspective / P. Le Neindre, C. Terlouw, X. Boivin [et al.] // J. Anim. Sci. – 2001. – Vol. 79. – P. E159–E165.
- T lymphocytes and vascular inflammation contribute to stress-dependent hypertension / P. J. Marvar, A. Vinh, S. Thabet [et al.] // Biological psychiatry. – 2012. – Vol. 71, Is. 9. – P. 774–782. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.01.017.
- Minois N. Polyamines in aging and disease / N. Minois, D. Carmona-Gutierrez, F. Madeo // Aging (Albany NY). – 2011. – Vol. 3, № 8. – P. 716.
- 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.
- Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes / M. Reyes-Becerril, F. Ascencio-Valle, D. Tovar-Ramirez [et al.] // Fish Shellfish Immunol. – 2010. – Vol. 30, Is. 1. – P. 248–254.

БІОЛОГІЯ

13. Stockman C. A. Flooring and driving conditions during road transport influence the behavioural expression of cattle / C. A. Stockman, T. Collins, A. L. Barnes [et al.] // Applied Animal Behaviour Science. – 2013. – Vol. 143, № 1. – С. 18–30.

УДК 636. 2:612. 176:017

ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ КРОВІ БУГАЙЦІВ ЗА УМОВ СТРЕСУ

Грабовський С. С.

Резюме. Стаття присвячена дослідженням відносної кількості Т- і В-лімфоцитів у крові бугайців при застосуванні імуномодуляторів тваринного походження за умов передзабійного стресу. Тваринам дослідних груп за п'ять діб до забою додатково до основного раціону аерозольним методом вносили екстракт селезінки (70° спиртовий розчин об'ємом 0,7 мл/кг), одержаний з використанням ультразвуку. Бугайцям контрольної групи за п'ять діб до забою до корму додавали 70° розчин етанолу в аналогічному об'ємі.

У цільній крові визначали відносну кількість Т- і В-лімфоцитів та їх окремих популяцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана, проводили диференційований підрахунок розеткоуттворюючих лімфоцитів з різним ступенем функціональної активності.

Введення бугайцям імуномодуляторів природного походження мало стимулювальний вплив на кількість Т- і В-лімфоцитів і функціональну активність Т- і В-клітинного імунітету. Як імуномодулятори та антистресори, поліаміни з екстракту селезінки мали найбільший вплив на деякі показники Т- і В-клітинного імунітету – зростання відносної кількості Т-хелперних клітин за рахунок середньоавідних та високоавідних у крові бугайців перед їх забоєм.

Результати, отримані нами в експерименті, можуть бути використані у дослідженнях показників клітинного імунітету з метою підвищення резистентності організму, корекції передзабійного стресу.

Ключові слова: бугайці, передзабійний стрес, екстракт селезінки, Т- і В-лімфоцити.

УДК:636. 2:612. 176:017

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА КРОВИ БЫЧКОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Грабовский С. С.

Резюме. Статья посвящена исследованию относительного количества Т- и В-лимфоцитов в крови бычков при применении иммуномодуляторов животного происхождения в условиях предубойного стресса. Животным опытных групп за пять суток до убоя дополнительно к основному рациону аэрозольным методом вносили экстракт селезенки (70° спиртовый раствор объемом 0,7 мл/кг), полученный с использованием ультразвука. Бычкам контрольной группы за пять дней до убоя к корму добавляли 70° раствор этанола в аналогичном объеме.

В цельной крови определяли относительное количество Т- и В-лимфоцитов и их отдельных популяций в реакции спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана, проводили дифференцированный подсчет розеткообразующих лимфоцитов с разной степенью функциональной активности.

Введение бычкам иммуномодуляторов естественного происхождения имело стимулирующее влияние на количество Т- и В-лимфоцитов и функциональную активность Т- и В-клеточного иммунитета. Как иммуномодуляторы и антистресоры, полiamины из экстракта селезенки имели наибольшее влияние на некоторые показатели Т- и В-клеточного иммунитета – рост относительного количества Т-хелперных клеток за счет среднеавидных и высокоавидных в крови бычков перед их убоем.

Результаты, полученные нами в эксперименте, могут быть использованы в исследованиях показателей клеточного иммунитета с целью повышения резистентности организма, коррекции предубойного стресса.

Ключевые слова: бычки, предубойный стресс, экстракт селезенки, Т- и В-лимфоциты.

UDC 636. 2:612. 176:017

Natural Origin Immunomodulators Influence on Cellular Immunity Indices in Bulls Blood Under Stress

Grabovskyi S. S.

Abstract. The article is devoted to the researching of some cellular immunity indices content in bulls blood before experiment beginning, before transportation, after transportation and before slaughter under using of animal origin immunomodulator.

Object and research methods. The experiment was conducted on 10 bulls with standard diet.

The two groups of bulls 12 month of age (five bulls of each) was formed for research.

The spleen extract as the biologically active substances has been additionally entered to the bulls feed at five days before slaughter. The spleen extract (70° alcohol solution in volume 0.7 mg/kg) was added to the diet of bulls of experimental groups by aerosol method. This extract was obtained with ultrasound application. 70° alcohol solution in the same volume and the same method was added to the diet of bulls of control group five days before slaughter.

The feed eating by bulls was exercised daily.

The bulls ate food completely.

The bulls slaughter was carried out in the dinner time.

БІОЛОГІЯ

Mathematical treatment of the research results worked 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 $P \leq 0.05$.

Results and discussion. We measured the ratio some immunity indices blood of bulls, which in addition to the feed fed of natural origin biologically active substances of the spleen extract.

The relative amount of T- and B-lymphocytes and its some populations in the reaction of spontaneous rosetting with the ram erythrocytes in the blood bulls was determined. Thus, the differentiated count of rosetting lymphocyte with the different functional activity degree was conducted.

As a result of research was found that T- and B-lymphocytes amount and functional activity T- and B-cell immunity was stimulated after additional supplementary to bulls diet experimental natural origin immunomodulators. Spleen extract polyamines as the immunomodulators and antistressors most effectively influenced on some T- и B-cell immunity indices in bulls blood before slaughter.

All specific immunity indices changes of bulls blood were almost at the same level and within the physiological norm before and during experiment.

Before experiment beginning (preparatory period) decreasing of T-lymphocytes relative quantity in the bulls blood of experimental group compared to control: T-cell active – by 10% ($P < 0.05$) and T-cell total (undifferentiated or «zero») – by 5% ($P < 0.01$) was determined.

The relative amount of T-cell helpers were changed before transportation: increase of T-helper lymphocytes in the bulls blood of experimental group was caused by lymphocytes with law (3–5) – by 18% ($P < 0.05$) and decrease of T-helper lymphocytes with middle (6–10) – by 26% ($P < 0.01$) compared to the control. The higher relative amount of T-suppressor cells by 9% ($P < 0.05$) also were found in the blood of bulls which were received the spleen extract obtained with ultrasound application.

It is shown increase of T-lymphocytes quantity in bulls blood, which received of spleen extract polyamines was caused by T-cell total – by 7% ($P < 0.05$) and T-cell helper – by 11% ($P < 0.05$) compared to the control.

Aerosol introduction of spleen extract to the bulls feed strengthens the cells receptor apparatus of bulls blood cells after transportation and before slaughter: the quantity of T-lymphocytes total with law (3–5) density receptors – by 10% ($P < 0.05$) was increased in blood of bulls compared to the control.

The results which obtained in experiment can to use in researches of cell immunity indices on farm animals for organism resistance increasing, correction and avoid their pre-slaughter stress.

Keywords: bulls, pre-slaughter stress, spleen extract, T- and B-lymphocytes.

*Рецензент – проф. Гапон С. В.
Стаття надійшла 05. 03. 2015 р.*