



УДК 636.5/.6+612.176:017

Вплив імуномодуляторів природного походження на показники клітинного імунітету крові курчат-бройлерів в умовах стресу

С.С. Грабовський¹, О.С. Грабовська²

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, Україна

²Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна

Досліджено відносну кількість Т- і В-лімфоцитів у крові курчат-бройлерів у випадку застосування імуномодуляторів тваринного походження за умов передзабійного стресу. Птиці дослідних груп за п'ять днів до забою додатково до основного раціону вводили аерозольним методом екстракт селезінки (70° спиртовий розчин об'ємом 1,4 мл на курча), одержаний із застосуванням і без застосування ультразвуку. Курчатам-бройлерам контрольної групи за п'ять днів 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 розеткотвірних лімфоцитів із різним ступенем функціональної активності. Уведення курчатам-бройлерам 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 курчат-бройлерів перед їх забоем. Результати, отримані нами в експерименті на курчатах-бройлерах, можуть бути використані у дослідженнях показників клітинного імунітету у сільськогосподарських тварин із метою підвищення резистентності організму, корекції передзабійного стресу.

Ключові слова: передзабійний стрес; екстракти селезінки; Т- і В-лімфоцити; поліаміни; путресцин; спермідин; спермін

Influence of immunomodulators of natural origin on cellular immunity indices in blood of broiler chicken under stress

S. Grabovsky¹, O. Grabovska²

¹S.Z. Gzhytskyj National University of Veterinary Medicine and Biotechnology, Lviv, Ukraine

²Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, Ukraine

The paper deals with researching of T- and B-lymphocytes relative quantity and functional activity in broiler chicken blood after using of animal origin immunomodulators in conditions of pre-slaughter stress. The authors determined the relative amount of T- and B-lymphocytes and their individual populations in the reaction of spontaneous rosetting with the sheep erythrocytes in blood. Besides, the differentiated count of rosetting lymphocytes with the various degree of functional activity was conducted. The spleen extract (70% alcohol solution in volume of 1.4 ml per chicken) was added to the diet of broiler chicken of experimental groups by aerosol method. This extract was obtained with/ without ultrasound application. 70% alcohol solution in the same volume and using the same method was added to the diet of broiler chicken of the control group five days before slaughter. The authors have not established probable increase of T-lymphocytes general quantity in broiler chicken blood in both experimental groups. It is shown that pre-slaughter stress in broiler chicken caused by weaning has immuno-suppressive effect on T- and B-lymphocytes in blood, which is accompanied by their quantity and functional activity decrease. T- and B-lymphocytes amount and functional activity of T- and B-cell immunity was stimulated after adding immunomodulators of natural

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, Львів 79010, Україна

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj, 50, Pekarska St., Lviv, 79010, Ukraine
Tel.: +38-096-950-00-01. E-mail: grbss@ukr.net

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна
Institute of Animal Biology of NAAS, V. Stus str., 38, Lviv, 79034, Ukraine
Tel.: +38-096-279-26-33. E-mail: alice_grb@ukr.net

origin to broiler chicken diet. Spleen extract polyamines as immunomodulators and antistressors most effectively influenced on some of cell immunity indices before slaughter – it is necessary to note the increase in T-helper lymphocytes in the broiler chickens blood caused by lymphocytes with medium (6–10) – by 18% ($P < 0.05$) and high density receptors (M) – by 35% ($P < 0.05$) compared to the control. It is shown that decrease of T-lymphocytes quantity in broiler chicken blood is caused by lymphocytes with low (3–5) – by 22% ($P < 0.01$) and high (M) – by 11% ($P < 0.05$) density receptors with increase of medium density receptors (6–10) – by 15% ($P < 0.05$) compared to the control. The results obtained in the experiment can be used in the investigations of cell immunity indices of farm animals in order to increase the organism resistance and to correct their pre-slaughter stress.

Keywords: pre-slaughter stress; spleen extracts; T- and B-lymphocytes; polyamines; putrescin; spermine; spermidine

Вступ

Із літературних джерел відомо про вплив стресу різного характеру (Palme et al., 2000; Bristow et al., 2007) на T- і B-клітинний імунітет (Kiseljova et al., 2012; Groer et al., 2013), про механізм розвитку реакцій гомеостатичних систем на зовнішній подразник (Nezhinskaja et al., 2006; Kaminska et al., 2008). Складний комплекс імунокомпетентних клітин – основа імунної системи. T-лімфоцити здатні розрізняти тільки короткі пептидні фрагменти білкових антигенів, а B-лімфоцити здатні розпізнавати антигени в розчині і зв'язувати білкові, полісахаридні та ліпопротеїдні розчинні антигени (Larovets et al., 2014).

Автори (Hermans et al., 2012; Maroufyan et al., 2012; Rowland et al., 2015) досліджували вплив інфекційних і неінфекційних захворювань на імунну відповідь різних генетичних ліній курчат. Інші роботи присвячені впливу біологічно активних речовинами на імунний статус курей із використанням дріжджів (Paul et al., 2013), аргініну та вітаміну E (Liu et al., 2014), пробіотиків (Kim et al., 2011), β -глюкану (Paul et al., 2012) та різних імуномодуляторів (Ganguly et al., 2009, 2010).

У модельному експерименті на щурах ми вивчали вплив передзабійного стресу на клітинний імунітет. Внесення у корм щурам імуномодуляторів природного походження мало стимулювальний вплив на функціональну активність T- і B-клітинної ланки імунітету (Grabovskyi, 2014). У контролі вродженої імунної відповіді у вищих хребетних важливу роль відіграють поліаміни (спермідин, спермін та путресцин), які можуть сприяти розвитку відповідної адаптивної імунної реакції (Minois et al., 2011; Maslyanko et al., 2013), поглинатися T- і B-лімфоцитами тощо. Вірогідно більший вміст поліамінів був у крові, печінці та грудному м'язі у курчат-бройлерів, яким до основного раціону вводили екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку, що дозволило використати цей субстрат як імуномодулятор та з'ясувати його дію ще й як антистресора (Grabovskyi, 2013, 2014).

У літературі недостатньо висвітлені питання про вплив передзабійного стресу тварин на окремі показники імунітету. У дослідженнях ми використали біологічно активні речовини природного походження (екстракт селезінки) для нівелювання стресу. Метою роботи було встановити, чи впливає екстракт селезінки на імунітет курчат-бройлерів в умовах передзабійного стресу.

Матеріал і методи досліджень

Дослід провели на 15 курчатах-бройлерах, яких утримували на стандартному раціоні ТзОВ «Великолюбін-

ське» смт. Великий Любінь Городоцького району Львівської області. Для дослідження сформували три групи птиці одномісячного віку (по п'ять курчат у кожній).

Як біологічно активні речовини у передзабійний період (за п'ять діб до забою) використовували спиртовий екстракт селезінки, одержаний із застосуванням ультразвуку (I група) та без застосування ультразвуку (II група). Екстракти наносили на комбікорм аерозольним методом (70% спиртовий розчин об'ємом 1,4 мл). Птиці контрольної групи аналогічно додавали до корму 70% розчин етанолу у такому ж об'ємі. Контроль за поїданням комбікорму здійснювали щоденно. Забій птиці проводили у ранковий час.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з птицею 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 (DIRECTIVE 2010/63/EU).

У цільній крові курчат-бройлерів визначали відносну кількість T- і B-лімфоцитів та їх окремих популяцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана. За кількістю еритроцитів, адсорбованих одним лімфоцитом, судять про ступінь активності лімфоцитів. Визначали відносну кількість загальних (TE-РУЛ – загальні розеткотвірні лімфоцити) та активних T-лімфоцитів (ТА-РУЛ – активні розеткотвірні лімфоцити). Для відмивання лімфоцитів використовували забуферений фізіологічний розчин (рН розчину – 7,2–7,4 (7,3)). Мононуклеарну фракцію клітин виділяли з гепаринізованої крові курчат-бройлерів. Мазки висушували, фіксували метанолом, фарбували 7–10 хв за Романовським – Гімза. Мікроскопію мазків робили під імерсією за збільшення 90 x 7. Лімфоцити за кількістю приєднаних еритроцитів: нульові – 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 понад 10 еритроцитів (M – морула).

Визначення відносної кількості теофілінрезистентних лімфоцитів (T-хелперів, Th) ґрунтується на тому, що ці клітини несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу M, а T-супресори – до імуноглобулінів класу G. Хелперні лімфоцити здатні формувати розетки після їх інкубації з теофіліном (теофілінрезистентні клітини). Кількість теофілінчутливих лімфоцитів (T-супресорів, Ts) визначали за різницею між кількістю TE-РУЛ та T-хелперів.

Визначали відносну кількість B-лімфоцитів, метод ідентифікації яких ґрунтується на наявності у них

мембранних імунoglobулінових рецепторів, що забезпечує приєднання до В-лімфоцитів індикаторних клітин, які на своїй поверхні містять комплемент-антиген-комплекс (ЕАС-РУЛ). Як індикаторні клітини використовували еритроцити барана, сенсibiliзовані антитілами та комплементом. Для приготування комплемент-антиген-комплексу використовували готову рідку гемолітичну сироватку (титр 1 : 1200) та готовий сухий комплемент морської свинки (Vlizlo et al., 2012).

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою пакета програм Statistica 6.0. Вірогідність різниці середніх оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Аналізуючи отримані результати досліджень окремих показників імунного статусу організму курчат-бройлерів, не встановили вірогідних різниць кількості загальних і активних Т-лімфоцитів у крові курчат-бройлерів обох дослідних груп (табл.). Відмічено зменшення кількості активних Т-лімфоцитів із низькою щільністю рецепторів, тобто низькоавідних (малодиференційованих) (3–5) на 22% ($P < 0,01$) та з високою щільністю рецепторів, тобто високоавідних (М) – на 11% ($P < 0,05$) при збільшенні середньоавідних (6–10) на 15% ($P < 0,05$).

Таблиця

Кількість Т- і В-лімфоцитів та їх функціональна активність у крові курей (од., $M \pm m$, $n = 5$)

Показники	Група тварин		
	I	II	контрольна
Т-загальні (ТЕ-РУЛ), %	23,6 ± 0,52	24,8 ± 1,36	23,8 ± 1,39
недиференційовані (0)	76,4 ± 0,52	75,2 ± 1,32	76,2 ± 1,35
низькоавідні (3–5)	6,0 ± 2,71	5,2 ± 1,13	4,6 ± 1,53
середньоавідні (6–10)	11,4 ± 0,63	12,8 ± 0,46	14,2 ± 1,81
високоавідні (М)	6,2 ± 1,66	6,8 ± 0,81	5,0 ± 1,02
Т-активні (ТА-РУЛ), %	47,2 ± 1,18	48,0 ± 4,04	48,2 ± 1,37
недиференційовані (0)	52,8 ± 1,19	52,0 ± 4,08	49,8 ± 3,38
низькоавідні (3–5)	11,4 ± 0,51**	14,0 ± 2,52	14,6 ± 2,71
середньоавідні (6–10)	27,2 ± 1,13*	23,8 ± 2,44	23,0 ± 2,33
високоавідні (М)	8,6 ± 0,51*	10,2 ± 3,46	10,6 ± 0,91
Т-хелпери (Th), %	34,6 ± 0,61	33,2 ± 1,91	33,2 ± 2,35
недиференційовані (0)	65,4 ± 0,53	66,6 ± 2,18	66,8 ± 2,38
низькоавідні (3–5)	7,6 ± 2,22	8,0 ± 1,09	10,4 ± 1,81
середньоавідні (6–10)	18,2 ± 0,45*	14,6 ± 2,13	15,0 ± 1,02
високоавідні М	9,8 ± 1,64*	10,6 ± 2,48	6,4 ± 0,55
Т-супресори (Ts), %	12,6 ± 0,51**	14,8 ± 4,08	15,0 ± 1,91
В-лімфоцити, %	53,6 ± 0,51**	52,2 ± 2,85	52,0 ± 1,43
недиференційовані (0)	46,4 ± 0,62**	47,8 ± 2,81	48,0 ± 1,48
низькоавідні (3–5)	21,0 ± 2,73	20,2 ± 3,05	20,6 ± 1,53
середньоавідні (6–10)	23,8 ± 1,61	23,6 ± 2,52	22,4 ± 1,71
високоавідні М	8,8 ± 1,62	8,4 ± 1,18	9,0 ± 1,45

Примітки: статистична вірогідність різниці * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ порівняно з контролем; Т-лімфоцити малодиференційовані (низькоавідні або клітини з малою щільністю поверхневих рецепторів) приєднали 3–5 еритроцитів; Т-лімфоцити середньоавідні (6–10) або клітини з середньою щільністю поверхневих рецепторів приєднали 6–10 еритроцитів; Т-лімфоцити високодиференційовані (високоавідні) утворили розетки з понад 10 еритроцитів (М – морула).

Слід відмітити зростання відносної кількості Т-хелперних клітин (Th) за рахунок середньоавідних (6–10) на 18% ($P < 0,05$) та високоавідних на 35% ($P < 0,05$). Спостерігали незначне зменшення відсотка Т-супресорів (Ts) у крові курчат-бройлерів дослідної групи (на 3%, $P < 0,05$) і тенденцію до збільшення кількості В-лімфоцитів за рахунок низькоавідних і середньоавідних клітин. Із цих даних випливає, що внесення екстракту селезінки у корм курчатам-бройлерам дослідних груп має вплив на функціональні властивості Т-лімфоцитів крові, зокрема, на рецепторний апарат клітин, про що повідомляють автори (Abbas et al., 2008), котрі у разі ін'єкції АКТГ спостерігали істотне зменшення лімфоцитів у крові. Отримані дані відрізняються від повідомлень (Gunchak et al., 2012), де випоювання курчатам-бройлерам настою з евкаліпту з додаванням вітаміну С стимулювало активність Т-В-клітинної ланки імунітету.

Виявлено більшу кількість Т- і В-лімфоцитів та вищу функціональну активність імункомпетентних клітин за рахунок перерозподілу авідності рецепторного апарату

Т- і В-лімфоцитів: збільшення кількості лімфоцитів із низькою та середньою щільністю рецепторів і зменшення недиференційованих у функціональному відношенні клітин у крові гусенят та індичат, яким до раціону вводили вітамін Е. Токоферол мав стимулювальний вплив на бластогенез Т-лімфоцитів крові індичат і гусенят (Mudrak et al., 2012).

Подібні дослідження проведено Liu et al. (2014), де використано для стимулювання імунітету аргінін, який є субстратом поліамінів (путресцину, сперміну та спермідину). У наших дослідженнях запропоновано використовувати власне поліаміни, які проявили імунотулювальну дію.

Висновки

Біологічно активні речовини і, зокрема, поліаміни з екстракту селезінки як імунотулюатори та антистресори впливають на показники Т- і В-клітинного імунітету крові курчат-бройлерів перед їх забоем, підвищують

резистентність організму, коригують та нівелюють вплив стресу перед забоєм тварин.

Перспективою подальших розвідок стане дослідження показників клітинного імунітету у крові свиней та великої рогатої худоби у разі використання імуномодуляторів та антистресорів, які містяться в екстракті селезінки, за умов передзабійного стресу.

Бібліографічні посилання

- Abbas, A.O., El-Dein, A.A., Desoky, A.A., Galal, M.A., 2008. The effects of photoperiod programs on broiler chicken performance and immune response. *Int. J. Poultry Sci.* 7(7), 665–671.
- Bristow, D.J., Holmes, D.S., 2007. Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle. *Physiol. Behav.* 90, 626–628.
- Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhyay, S.K., 2009. Immunostimulants-their significance in finfish culture. *Fishing Chimes* 29(7), 49–50.
- Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhyay, S.K., 2010. Immunostimulant, probiotic and prebiotic – their applications and effectiveness in aquaculture: A Review. *Isr. J. Aquacult. Bamid.* 62(3), 130–138.
- Grabovskyi, S.S., 2013. Jekstragirovanie biologicheskii aktivnykh veshchestv selezenki s ispolzovaniem ultrazvuka [Extracting of biologically active substances of spleen with the application an ultrasound]. *Sbornik Nauchnykh Trudov SWorld.* Markova A.D., Ivanovo 4(49), 3–6 (in Russian).
- Grabovskyi, S.S., 2014. Vmist poliaminiv ta yikh korektsiya u krovi ta tkanyakh kurchat-broyleriv za umov stresu [Polyamines content and its correction in broiler chickens blood and tissues at pre-slaughter stress]. *Bioloziya Tvaryn* 16(2), 18–25 (in Ukrainian).
- Grabovskyi, S.S., 2014. Vplyv imunomodulyatoriv pryrodnoho pokhodzhennya na pokaznyky klitynnoho imunitetu i riven kortyzolu v krovi shchuriv za umov stresu [Effect of natural immunomodulators influence on cellular immunity indices and cortisol level in rat's blood at pre-slaughter stress]. *Biolozhichni Studiyi* 8(1), 93–102 (in Ukrainian).
- Groer, M., Wolfe, S., Park, C.R., 2013. Reduction of hair glucocorticoid levels in an animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Brain Behav. Immun.* 68(32), e20.
- Gunchak, A.V., Ratuch, I.B., Kaminska, M.V., 2012. Sklad mikroflory slipykh kyshok ta pokaznyky klitynnoho imunitetu u kurchat-broyleriv za diyi fitopreparatu [Composition of cecum microflora and indices of cellular immunity in broiler chickens under the action of phytomedication]. *Bioloziya Tvaryn* 14(1–2), 518–523 (in Ukrainian).
- Hermans, D., Pasmans, F., Heyndrickx, M., Van Immerseel, F., Martel, A., Van Deun, K., Haesebrouck, F.A., 2012. Tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit. Rev. Microbiol.* 38(1), 17–29.
- Kaminska, M.V., Nechay, H.I., Tsepko, N.I., Kolisnyk, H.V., 2008. Vplyv karotynovmisnoyi biomasy drizhdzhiv ta β -karotynu na sklad mikroflory ta imunnyy status shchuriv [Influence carotenecontaining yeast biomass and β -carotene on the microfloras composition and immune status of rats]. *Bioloziya Tvaryn* 10(1–2), 261–265 (in Ukrainian).
- Kim, G.B., Seo, Y.M., Kim, C.H., Paik, I.K., 2011. Effect of dietary probiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Sci.* 90(1), 75–82.
- Kiseljova, N.M., Kuzmenko, L.H., Nkane Nkoza, M.M., 2012. Stress i limfocity [Stress and lymphocytes]. *Pediatrics* 91(1), 137–143 (in Russian).
- Lapovets, L.Y., Lutsyk, B.D., Lebed, H.B., 2014. Posibnyk z laboratornoyi imunolohiyi [Handbook of laboratory immunology]. FOP Krayevskyy R.P., Lviv (in Ukrainian).
- Liu, X., Byrd, J.A., Farnell, M., Ruiz-Feria, C.A., 2014. Arginine and vitamin E improve the immune response after a *Salmonella challenge* in broiler chicks. *Poultry Sci.* 93(4), 882–890.
- Maroufyan, E., Kasim, A., Ebrahimi, M., Loh, T.C., Bejo, M.H., Zerihun, H., Hosseini, F., Goh, Y.M., Farjam, A.S., 2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids enrichment alters performance and immune response in infectious bursal disease challenged broilers. *Lipids Health Dis.* 11(1), 1–10.
- Masyanko, R.P., Grabovskyi, S.S., Grabovska, O.S., 2013. Suchasni uyavleniya pro fahotsytoz [Modern notion of phagocytosis]. *Bioloziya Tvaryn* 15(3), 63–69 (in Ukrainian).
- Mudrak, D.I., Vishchur, O.I., Broda, N.A., Ohorodnyk, N.Z., Solovodzinska, I.Y., 2012. Stan T- i V-klitynnoyi lanok imunitetu v indykyv ta husey za riznoho rivnya vitaminu E u ratsioni [State T- and B-cell immunity in parts of turkeys and geese for various levels of vitamin E the diet]. *Bioloziya Tvaryn* 14(1–2), 535–539 (in Ukrainian).
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., 2011. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)* 3(8), 716–732.
- Nezhinskaja, G.I., Petrova, N.N., 2006. Rol stimuljacii B-limfocitov v profilaktike stress-inducirovannykh jazv zheludka u krys linii vistar [Role of B-lymphocytes incentive in prevention of stress-inducible stomach ulcers in Wistar rats]. *Citokiny i vospalenie* 5(1), 34–36 (in Russian).
- Official Journal of the European Union L276/33, 2010. 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.
- Palme, R., Robia, C., Baumgartner, W., Möstl, E., 2000. Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolites. *Vet. Rec.* 146, 108–109.
- Paul, I., Isore, D.P., Joardar, S.N., Samanta, I., Biswas, U., Maiti, T.K., Mukhopadhyay, S.K., 2012. Orally administered β -glucan of edible mushroom (*Pleurotus florida*) origin upregulates innate immune response in broiler. *Indian J. Anim. Sci.* 82(7), 745–748.
- Paul, I., Isore, D.P., Joardar, S.N., Roy, B., Aich, R., Ganguly, S., 2013. Effect of dietary yeast cell wall preparation on innate immune response in broiler chickens. *Indian J. Anim. Sci.* 83(3), 307–309.
- Rowland, K., Kaiser, M.G., Lamont, S.J., 2015. Simulated bacterial infection in three diverse lines of chickens causes different immune responses: Changes in body temperature and gene expression levels. *Animal Industry Report* 661(1), 57.
- Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S., Ratych, I.B., 2012. Laboratorni metody doslidzhen u bioloziyi, tvarynyntstvi ta veterynarniy medytsyni [Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary]. Spolom, Lviv (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 14.03.2015