Кокарєв А. В. Формування клітинного імунітету супоросних свиноматок за дії препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки Lactobacillus Delbrueckii / А. В. Кокарєв, Д. М. Масюк // «Наукові праці ПФ НУБіП України «КАТУ». – 2012. – № 148. – С. 150 – 156.

УДК 636.4:612.017

Кокарєв А. В., аспірант (kokarev.a.v@gmail.com)
Масюк Д. М., к.вет.н., доцент (plppm@ua.fm)

Дніпропетровський державний аграрний університет

ФОРМУВАННЯ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ СУПОРОСНИХ СВИНОМАТОК ЗА ДІЇ ПРЕПАРАТУ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ LACTOBACILLUS DELBRUECKII

Наведено результати дослідження дії препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки Lactobacillus Delbrueckii на формування клітинного імунітету у супоросних свиноматок. Встановлено, що за дії препарату відбулось підвищення загальної кількості Т-, В- і NK-лімфоцитів. Відмічалося зростання фагоцитарної активності лейкоцитів, індексу завершеності фагоцитозу та показнику НСТ.

Ключові слова: *свиноматки, імунна система, лімфоцити, НСТ, фагоцитарна активність, препарат ферментативного гідролізу клітинної стінки Lactobacillus Delbrueckii*

Актуальність проблеми. У сучасних умовах ведення свинарства на організм тварин постійно діє комплекс антропогенних факторів, пов'язаних з технологією вирощування та відгодівлі, способами утримання, догляду та годування. Їх сукупність впливає на пристосувально-адаптаційні механізми тварин, змінюючи їх, що призводить до зниження неспецифічної резистентності та імунітету. Найбільш чутливими до дії несприятливих чинників є високопродуктивні, вагітні та новонароджені тварини. Для підвищення опорної здатності чутливого організму, актуальності набуло питання щодо використання імунотропних препаратів різноманітного походження [1]. До найбільш перспективних препаратів для корекції стану імунної системи організму відносяться імуномодулятори, які здатні відновлювати і посилювати імунний захист тварин. Їх поділяють за походженням на мікробіологічні, тимічні, цитокінні, рослинні та хімічні групи [2]. Більш ефективними вважається група бактеріологічного походження, оскільки система неспецифічного захисту розпізнає патогенассоційовані молекулярні структури цих препаратів і тим самим підтримується в активному стані. Але більшість цих препаратів володіють імуностимулюючими властивостями, що обмежує спектр їх використання [3]. Тому, пошук нових препаратів, що володіють імуномоделюючими властивостями є перспективним напрямком ветеринарної науки на теперішній час. Одним з таких засобів є ферментативний гідролізат клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii*. Це імунотропний препарат

мурамілпептидного ряду, який представляє собою виділені й очищені шляхом ряду складних біотехнологічних процесів розчинні фрагменти клітинної стінки спеціально селектованої молочнокислої бактерії *Lactobacillus Delbrueckii*.

Мета роботи – встановити дію препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* на формування клітинного імунітету супоросних свиноматок.

Матеріал і методи дослідження. Робота виконана на базі НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського ДАУ та приватного акціонерного товариства "Агро-Союз" Синельниківського району, Дніпропетровської області.

Дослідження були проведені на свиноматках помісі порід великої білої та ландрас. За принципом пар аналогів було сформовано дослідна та контрольна групи свиноматок на 60 добу супоросності, з середньо живою масою 210 кг. Кожна група в своєму складі нараховувала по 10 голів. Тваринам дослідної групи внутрішньом'язово вводили препарат ферментативного гідролізату клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* у дозі 4мг на 100 кг живої маси. Тваринам контрольної групи - 0,9% розчин NaCl. Кров для досліджень відбирали на 15 добу після застосування препарату.

У цільній крові свиноматок визначали відносну кількість Т-лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами вівці (M. Jondal et al., 1972). Вміст В-лімфоцитів та NK-лімфоцитів визначали за допомого моноклональних антитіл до їх специфічних маркерних рецепторів CD 22 та CD 16 відповідно.

Фагоцитарну активність лейкоцитів, фагоцитарне число та індекс завершеності фагоцитозу визначали за активністю поглинання мікробних клітин тест-культури *Staphylococcus aureus*. Функціональну активності нейтрофілів визначали за допомогою тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [4].

Біометричну обробку експериментальних даних проводили статистично з розрахунком критеріїв достовірності та коефіцієнту кореляції за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel з використанням вбудованих статистичних функцій.

Результати дослідження. У результаті проведених досліджень встановлено, що за дії препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* відмічалась негативна кореляція між збільшенням кількості Т- В- і NK-лімфоцитів та зменшенням фракції 0-лімфоцитів. Також спостерігалось зростання фагоцитарної активності лейкоцитів, індексу завершеності фагоцитозу та кількості нейтрофілів з активованим киснезалежним механізмом бактерицидної активності.

Згідно з сучасними уявленнями про клітинну імунологію розрізняють наступні групи клітини – основні (лімфоцити) та допоміжні (фагоцити, антиген презентуючі клітини, макрофаги та ін.). Кожна з цих груп, виконуючи певні функції, працює в тісному взаємозв'язку одна з одною, в наслідок чого формується імунологічний бар'єр організму [5,8].

Проведені дослідження показали, що застосування супоросним свиноматкам препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* підвищує рівень захисних сил організму і неспецифічного імунітету. На це вказує вірогідне збільшення у свиноматок дослідної групи загальної кількості Т-лімфоцитів з низькою та середньою щільністю мембранних рецепторів на 12% та 18% відповідно у порівнянні з тваринами контрольної групи (таблиця 1).

Таблиця № 1

Співвідношення різних видів лімфоцитів у крові супоросних свиноматок за дії препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* (M±m, n=10)

Показники	Контрольна група	Дослідна група
Загальні Т-лімфоцити, %		
Загальна кількість	41,60±0,27	47,80±0,89***
Низькоавідні	29,70±0,52	33,40±1,11*
Середньоавідні	9,80±0,52	11,60±0,33*
Високоавідні	2,10±0,27	2,80±0,29
Теофілін резистентні Т-лімфоцити (хелпери), %		
Загальна кількість	24,50±0,59	29,30±0,38***
Низькоавідні	19,20±0,72	23,20±0,29***
Середньоавідні	4,00±0,31	4,30±0,29
Високоавідні	1,30±0,22	1,80±0,14
Теофілін чутливі Т-лімфоцити (супресори), %		
Загальна кількість	17,20±0,45	18,00±0,97
Низькоавідні	10,50±1,05	10,20±1,19
Середньоавідні	5,90±0,69	6,80±0,38
Високоавідні	0,80±0,14	1,00±0,18
В-лімфоцити, %		
Загальна кількість	27,50±0,73	34,10±0,69***
Низькоавідні	22,40±0,21	27,20±0,84***
Середньоавідні	3,60±0,21	5,00±0,40*
Високоавідні	1,50±0,43	1,90±0,37
NK-лімфоцити, %	7,80±0,29	12,60±0,60***

0-лімфоцити, %	23,10±0,60	5,50±0,73***

* – p ≤ 0,05; ** – p ≤ 0,01; *** – p ≤ 0,001 відносно до контрольної групи

При цьому, ці зміни проходили на тлі зростання фракції теофілін резистентних лімфоцитів (Т-хелперів) переважно з низькою щільністю мембранних рецепторів на 21% (p ≤ 0,001). Достовірних змін стосовно теофілін чутливих лімфоцитів (Т-супресорів) не виявлено. Ймовірно, збільшення кількості теофілін резистентних Т-лімфоцитів і загальної кількості Т-лімфоцитів у цілому, пояснюється здатністю досліджуваного препарату впливати на процеси фенотипного дозрівання тимоцитів шляхом посилення експресії мембранних рецепторів які підвищують функціональну активність Т-лімфоцитів [5,6].

В периферичній крові дослідної групи свиноматок відбулись достовірні (p ≤ 0,001) зміни у популяції В-лімфоцитів. Загальна їх кількість збільшилась на 24% за рахунок зростання фракції клітин з низькою та середньою щільністю мембранних рецепторів відповідно на 21% та 39% у порівнянні з показниками контрольної групи тварин. Напевно, підвищення кількості В-лімфоцитів з низькою та середньою щільністю мембранних рецепторів є результатом дії досліджуваного препарату на процеси розвитку та диференціації лімфоцитів у кістковому мозку. На це ж вказує і достовірне зростання фракції природних кілерів (NK-лімфоцитів) на 62% (p ≤ 0,001) у порівнянні з тваринами контрольної групи. Відомо, що шлях утворення природних кілерів є відгалуженням від раннього етапу Т-клітинної диференціації у кістковому мозку і має спільні ріст-стимулюючі фактори [7]. Оскільки В-лімфоцити є попередниками клітин, які продукують антитіла, то збільшення їх кількості у крові супоросних свиноматок є ознакою підвищеної здатності організму до активного синтезу захисних антитіл [5].

Різких змін зазнала група 0-лімфоцитів. Так, їх кількість, у порівнянні з контрольною групою свиноматок, достовірно (p ≤ 0,001) зменшилась у 4 рази. Оскільки, до числа 0-лімфоцитів відносять юні клітини, недозрілі, клітини, що тимчасово позбавлені рецепторів або мають блоковані рецептори Т- і В-лімфоцитів [3,5], можна припустити, що їх зменшення є наслідком посилення диференційних процесів у дослідних тварин.

Таким чином, можна припустити, що вплив препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* на імунокомпетентні клітини відбувається шляхом опосередкованої його дії на процеси формування та дозрівання цих клітин, в результаті чого підвищується рівень захисних сил організму як клітинного так і гуморального походження.

Серед багатьох показників, що характеризують імунний стан організму, важливо, враховувати функціонально-метаболічну активність фагоцитуючих клітин, адже вони формують одну з центральних ланок неспецифічного захисту організму, а їх дія спрямована на стабілізацію внутрішнього середовища макроорганізму – захист від чужорідних ендогенних і екзогенних агентів [9].

За результатами дослідження фагоцитарної ланки імунітету супоросних свиноматок встановлено стимулюючий вплив препарату на

високоспеціалізовані фагоцитарні клітини. Це позначилось достовірним збільшенням ($p \leq 0,05$) фагоцитарної активності лейкоцитів на 20% та індексу завершеності фагоцитозу на 67% у порівнянні з контрольною групою (таблиця 2).

Таблиця № 2

Активність фагоцитів у крові супоросних свиноматок за дії препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* (M±m, n=10)

Показники	Контрольна група	Дослідна група
Фагоцитарна активність лейкоцитів, %	29,20±2,30	35,00±0,79*
Фагоцитарне число, Од.	1,94±0,17	2,86±0,21*
Індекс завершеності фагоцитозу,Од	1,10±0,21	1,84±0,21*
НСТ, %	9,20±0,74	13,40±1,20*

* – $p \leq 0,05$ відносно до контрольної групи

Ці дані свідчать про стимулюючий вплив препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* на фагоцитарну активність лейкоцитів периферичної крові та їх перетравну здатність, що ймовірно, відбувається за рахунок підвищення здатності фагоцитів до хемотаксису та посилення активності фагосомальних ферментів [10].

Також, за впливу досліджуваного препарату, спостерігається збільшення у периферичній крові відсотку фагоцитуючих нейтрофілів з активованим киснезалежним механізмом бактерицидної активності. На це вказує зростання показнику НСТ у дослідних свиноматок на 46% ($p \leq 0,05$) по відношенню до контрольних свиноматок.

Отже, застосування препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* супоросним свиноматкам активізує процеси фагоцитозу та здатність клітин швидко знешкоджувати поглинуті бактерії, що посилює імунний захист супоросних свиноматок.

Висновки

1. Застосування супоросним свиноматкам препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* призводить до активації процесів формування та дозрівання лімфоїдних клітин.

2. За впливу препарату ферментативного гідролізу клітинної стінки *Lactobacillus Delbrueckii* в організмі супоросних свиноматок підвищується активність високоспеціалізованих фагоцитарних клітин та поліпшується їх перетравна здатність.

Література

1. Бугаєвський В.М. Вплив середовища та технології утримання на продуктивність свиней / Бугаєвський В.М., Остапенко О.М., Данильчук М.І. // “Еколгія” наукові праці.– 2010.– Т. 132.– №119.– с. 59 – 61;
2. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение / Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. М.: – 2005. – 28 с.;
3. Ахматова Н.К. Перспективы использования иммуномодуляторов микробного происхождения в качестве стимуляторов эффекторов врожденного иммунитета // Материалы конференции “Успехи современного естествознания”.–2005.– №10.– с. 35;
4. Шахов А.Г. Методические рекомендации по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных // А.Г. Шахов [и др.]. – Воронеж. – 2005.– 62 с.
5. Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология: Учебн. Пособие / В.Г. Галактионов.–М.: ИКЦ «Академкнига», 2005.– 408 с.: ил;
6. Морозов В.Г. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем – цитомедины / Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. // Успехи современной биологии.–1983.–Т.96, №3.–с. 339–352;
7. Калинина Н.М. NK клетки: новые представления // Тезисы докладов 3-й Всероссийской с международным участием школы-конференции по клинической иммунологии “Иммунология для врачей”. – Санкт-Петербург 29 января – 5 февраля 2012 г. – С.146.
8. Влияние миелопептидов на бактерицидную активность клеток периферической крови / Л.С. Мазунина [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии.– 2011.– № 4/1.– с. 140;
9. Долгушин И. И. Нейтрофилы и гомеостаз / Долгушин И.И., Бухарин О.В. – Екатеринбург.– 2001.– 280 с.
10. Мрозова О.С. Иммуномодулирующее влияние альгината калия на показатели на показатели клеточного иммунитета у взрослых при хронических воспалительных заболеваниях / О.С. Морозова, Л.К. Добродеева / Рос. аллергол. журн. –2010.–№1(1).– С. 123-125.

Summary

D. Masyuk, A. Kokarev

THE FORMATION OF CELLULAR IMMUNITY IN PREGNANT SOWS UNDER THE INFLUENCE OF THE PREPARATION ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELL WALL LACTOBACILLUS DELBRUESKII.

The results of researches the influence of the preparation enzymatic hydrolysis of cell wall lactobacillus delbrueskii on the formation of cellular immunity in pregnant sows are presented.The increase of the total number of T-, B-, NK-lymphosytes as a result of impast the preparation have been analyzed. The raise of phagocytic activity of leukocytes, index completion of phagocytosis, and index NST was observed.

Key words: *sows, the immune system, lymphocytes, NST, phagocytic activity, preparation enzymatic hydrolysis of cell wall Lactobacillus Delbrueckii*