

УДК 636. 52/58.083:636.085.16

UDC 636. 52/58.083:636.085.16

**ВЛИЯНИЕ ВЫПАИВАНИЯ ТЕЛЯТАМ
РАЗНЫХ ДОЗ ПРОБИОТИКА «ПРОВАГЕН»
И КОМПЛЕКСА ЭТОГО ПРОБИОТИКА С
ХИТОЗАНОМ НА МИКРОБИЦИДНУЮ
АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ**

**EFFECT OF DIFFERENT DOSES OF
WATERING THE PROBIOTIC "PROVAGEN"
AND COMPLEX OF THIS PROBIOTIC WITH
CHITOSAN ON MICROBICIDAL ACTIVITY
OF BLOOD NEUTROPHILS OF CALVES**

Крапивина Елена Владимировна
д.б.н. профессор

Krapivina Elena Vladimirovna
Dr.Sci.Biol., professor

Иванов Дмитрий Валерьевич
к.б.н.

Ivanov Dmiry Valerevich
Cand.Biol.Sci.

Феськов Андрей Иванович
аспирант
*Брянская государственная сельскохозяйственная
академия, Брянск, Россия*

Feskov Andpey Ivanovich
postgraduate student
Bryansk state agricultural academy, Bryansk, Russia

Фролова Марина Алексеевна
к.б.н.

Frolova Marina Alekseevna
Cand.Biol.Sci.

Албулов Алексей Иванович
д.б.н. профессор

Albulov Aleksey Ivanovich
Dr.Sci.Biol., professor

Буханцев Олег Васильевич
аспирант
*Всероссийский научно-исследовательский и
технологический институт биологической
промышленности, Щелково, Россия*

Buhantsev Oleg Vasilevich
postgraduate student
*All-Russia research and institute of technology of the
biological industry, Shchelkovo, Russia*

Ежедневное выпаивание в течение 7 суток пробиотика «Проваген» в дозе 14 г/гол и комплекса пробиотика (14 г/гол) с хитозаном (0,8 г/гол) оптимизировало гомеостаз, о чем свидетельствует выраженная тенденция к снижению до нормативных значений относительного содержания нейтрофилов в крови у телят

Daily watering (for 7 days) with probiotic "Provagen" at a dose of 14 g/head and complex probiotic (14 g/head) with chitosan (0.8 g/head) has optimized homeostasis, as evidenced by a strong tendency to reduce to the normative values of the relative content of neutrophils in the blood of calves

Ключевые слова: ПРОБИОТИК, ХИТОЗАН, ГОМЕОСТАЗ, НЕЙТРОФИЛЫ, МИКРОБИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ

Keywords: PROBIOTIC, CHITOSAN, HOMEOSTASIS, NEUTROPHILS, MICROBICIDAL ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS

Зачатки воспаления непрерывно возникают в организме, но они ликвидируются без внешних проявлений. Толчком к переходу "физиологического воспаления" в клинически значимый процесс является недостаточность компенсаторных защитных реакций. Любое воспаление начинается с фагоцитарных реакций и заканчивается ими. Одним из важнейших этапов фагоцитоза является деградация и обезвреживание поглощенного чужеродного материала с помощью оксидазных и кислородонезависимых механизмов фагоцитами и, в частности

нейтрофилами [1]. Гомеостаз животных в большой степени зависит от микрофлоры, населяющей желудочно-кишечный тракт. При дисбиотических состояниях нарушаются процессы переваривания корма, всасывания питательных веществ, развиваются воспалительные процессы в слизистой кишечника, возникают токсикозы. С целью оптимизации микробиоценоза кишечника и повышения уровня естественной резистентности организма у телят применяют пре- и пробиотики. Имеются сведения о положительном влиянии ветома 3 на организм телят, что обусловлено антагонистическими свойствами *Bacillus subtilis* по отношению к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, что оптимизирует микробиоценозы в кишечнике и нормализует обменные процессы в организме животного [2]. Аналогичные результаты были получены при скармливании ветома 3 пороссятам [3]. В состав пробиотика «Проваген», кроме *B. Subtilis* входит еще *B.licheniformis*. Скармливание этого пробиотика оказало положительный эффект при выращивании поросят [4].

Возможность использования хитозана в качестве пребиотика основывается в числе прочих свойств на том, что его макромолекулы состоят из связанных β -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина. В ферментной системе ЖКТ животных отсутствуют бетагликозидазы, что делает хитозан неперевариваемым. Такой фермент есть только у нормальной микрофлоры кишечника.

Целью наших исследований было изучение влияния выпаивания телятам разных доз пробиотика «Проваген» и комплекса этого пробиотика с хитозаном на микробицидную активность нейтрофилов крови.

Материалы и методы исследований. Для достижения поставленной цели были проведены 2 эксперимента. Для проведения 1 научно-хозяйственного опыта на МТФ СПК Агрофирма "Культура" с учетом живой массы и

интенсивности роста методом парных аналогов были сформированы 3 группы (по 10 голов) телят черно-пестрой породы 1-1,5-месячного возраста: 1 группа – контрольная, 2 и 3 – опытные. Телятам 2 группы ежедневно в течение 7 суток выпаивали пробиотик «Проваген» (14 г/голову), животным 2 группы - комплекс этого пробиотика (14 г/голову) с хитозаном (0,8 г/голову). Для проведения 2 научно-хозяйственного опыта на той же МТФ СПК Агрофирма "Культура" с учетом живой массы и интенсивности роста методом парных аналогов были сформированы 3 группы телят черно-пестрой породы 1-1,5-месячного возраста: 1 группа – контрольная (7 голов), 2 (6 голов) и 3 (7 голов) – опытные. Телятам 2 группы ежедневно в течение 7 суток выпаивали пробиотик «Проваген» (28 г/голову), животным 2 группы - комплекс этого пробиотика (28 г/голову) с хитозаном (1,6 г/голову). Телята содержались в соответствующих ветеринарно-зоогигиеническим требованиям условиях, получали хозяйственный рацион в соответствии с общепринятыми нормами [5] Эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755). Пробы крови брали утром до кормления из яремной вены перед началом экспериментов и после выпаивания препаратов у 5 голов из каждой группы.

Количество лейкоцитов в крови подсчитывали в камере Горяева, гематокрит - в гематокритной центрифуге. Кислородозависимую микробицидную активность нейтрофилов крови определяли с помощью НСТ-теста (+НСТ, %), основанного на восстановлении поглощенного растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан [6, 7]. Индекс активации нейтрофилов (ИАН) вычисляли согласно инструкции "Риакомплекс" по использованию НСТ-тест набора. Активность оксидазных систем нейтрофилов (+НСТ, %, ИАН) оценивали в

двух состояниях: базальном (баз.) - в свежевзятой крови, стабилизированной гепарином, и стимулированном (стим.) - после внесения в пробы крови зимозана, что моделирует условия бактериального заражения и характеризует адаптационные резервы поглотительной и микробицидной способности нейтрофильных гранулоцитов [8]. Относительное количество нейтрофилов крови, потенциально обладающих оксидазной активностью и проявляющих ее только после стимуляции клеток зимозаном (Δ НСТ, %) определяли как разницу между +НСТ стим., % и +НСТ баз., %. Показатель резерва оксидазной способности нейтрофилов периферической крови (ПР) и коэффициент их метаболической активации (К) рассчитывали по Пахмутову И.А., Ульяновой М.С. [9]. Кислородонезависимую микробицидность нейтрофилов периферической крови оценивали по содержанию в них катионных белков по методу В.И.Жибинова [10], рассчитывая средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле, предложенной Н.А.Макаревичем [11].

Полученные цифровые данные обработаны методом вариационной статистики. Для выявления статистически значимых различий использован критерий Стьюдента-Фишера по Н. А. Плохинскому [12]. В качестве значений физиологической нормы принимали интервалы соответствующих показателей, приведенные в литературе [13, 14].

Результаты исследований. В результате анализа проб крови животных подопытных групп, использованных в 1 опыте, установлено (табл. 1), что перед началом опыта содержание лейкоцитов соответствовало наиболее высоким нормативным значениям, по окончании его существенно не изменялось. Выпаивание препаратов телятам не оказало выраженного действия на этот показатель гомеостаза. Относительное содержание нейтрофилов всех ядерных форм в крови у телят 1 и 2 групп также

соответствовало наиболее высоким нормативным значениям, а у животных 3 группы даже несколько превышало их. По окончании опыта отмечены противоположно направленные процессы в содержании нейтрофилов в крови у подопытных животных: у телят 1 группы установлена тенденция к повышению уровня нейтрофилов в крови на 62,12%, а у животных 2 и 3 групп, напротив, к понижению на 18,38 и 24,47% соответственно. Это свидетельствует об оптимизирующем воздействии на гомеостаз использованных препаратов.

Изучение микробицидной активности нейтрофилов крови телят подопытных групп перед началом 1 опыта показало, что относительное количество нейтрофилов, проявляющих оксидазную активность в базальных условиях, несколько превышало нормативные значения. Известно, что аппарат кислородозависимой цитотоксичности начинает работать начиная с палочкоядерных форм. Восстановление НСТ происходит в 7,2% метамиелоцитов, 23,6% палочкоядерных и 39,6% сегментоядерных нейтрофилах [15].

Индукцированный НСТ-тест можно рассматривать как биохимический критерий готовности к завершённому фагоцитозу. Если же после стимуляции индуцируемая продукция ион-радикала кислорода практически не изменяется, это означает, что прооксидантно/антиоксидантная система несостоятельна, не способна обеспечить необходимый уровень его продукции [16].

В норме количество нейтрофилов, проявляющих +НСТ-активность в спонтанной пробе (базальный уровень) составляет у здоровых телят до 3-месячного возраста $10,2 \pm 4,5\%$, а в активированной пробе (при стимуляции) $50,6 \pm 4,3\%$. У больных животных показатели НСТ-теста повышены как в

базальном, так и в стимулированном состоянии. Так при бронхопневмонии телят +НСТбаз. составлял $48,2 \pm 5,4\%$, а +НСТстим. – $84,1 \pm 2,4\%$ [9].

Таблица 3. - Микробицидная активность нейтрофилов крови подопытных телят (1 опыт)

Показатель и	Перед началом опыта			После выпаивания препаратов		
	1 группа	2 группа	3 группа	1 группа	2 группа	3 группа
Лейкоциты, $10^9/л$	$9,17 \pm 0,60$	$10,29 \pm 2,48$	$10,88 \pm 1,25$	$10,32 \pm 1,42$	$8,99 \pm 1,04$	$13,14 \pm 3,97$
Сумма нейтрофилов, %	$31,15 \pm 4,12$	$29,92 \pm 6,74$	$39,03 \pm 1,14$	$50,50 \pm 1,016$	$24,42 \pm 5,09$	$29,48 \pm 1,28$
+НСТ баз., %	$23,55 \pm 3,92$	$11,50 \pm 2,80$	$16,13 \pm 3,25$	$12,80 \pm 1,74$	$9,80 \pm 1,52$	$13,30 \pm 1,87$
+НСТ стим., %	$29,35 \pm 2,06$	$24,73 \pm 3,21$	$26,70 \pm 4,20$	$41,90 \pm 5,81$	$27,00 \pm 4,11$	$26,60 \pm 2,41$
ΔНСТ, %	$5,80 \pm 3,71$	$13,23 \pm 3,03$	$10,57 \pm 3,59$	$29,10 \pm 5,48^{\Delta}$	$17,20 \pm 2,86$	$13,30 \pm 1,93^*$
ИАН баз.	$0,28 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$
ИАН стим.	$0,35 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,02$
К	$0,29 \pm 0,09$	$0,53 \pm 0,09$	$0,39 \pm 0,10$	$0,68 \pm 0,05^{\Delta}$	$0,63 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,06$
ПР	$1,32 \pm 0,33$	$2,63 \pm 0,71$	$1,59 \pm 0,41$	$3,43 \pm 0,50^{\Delta}$	$2,82 \pm 0,23$	$2,17 \pm 0,32$
СЦК	$1,01 \pm 0,13$	$0,89 \pm 0,05$	$0,87 \pm 0,07$	$1,50 \pm 0,14$	$1,32 \pm 0,08^{\Delta}$	$1,12 \pm 0,07$

Примечания: здесь и далее - *- $p < 0,05$ к 1 группе, ° - $p < 0,05$ -к 2 группе, Δ - $p < 0,05$ – к предыдущему периоду

Внесение в пробы крови телят 1, 2 и 3 групп зимозана перед началом опыта вызвало увеличение числа НСТ-позитивных нейтрофилов на 24,63, 115,04 % ($p < 0,05$) и 65,53 % ($p > 0,05$) соответственно. В связи с этим

коэффициент метаболической активации нейтрофилов и показатель резерва оксидазной активности нейтрофильных гранулоцитов у телят 1 группы в начале опыта был ниже, чем у животных 2 группы на 45,28 и 49,81 %, и чем у телят 3 группы на 25,64 и 16,98 % соответственно.

После выпаивания препаратов отмечена тенденция к снижению относительного числа клеток, проявляющих оксидазную активность в базальных условиях на 45,65, 14,78 и 17,54 % у животных 1, 2 и 3 групп соответственно по сравнению с началом опыта, что указывает на оптимизацию гомеостаза у подопытных животных.

Внесение в этот период в пробы крови телят 1, 2 и 3 групп зимозана обусловило достоверно значимое повышение по сравнению с базальным уровнем содержание оксидазно активных нейтрофилов на 227,34, 175,51 и 100,00 % соответственно, что указывает на увеличение адаптационного резерва этого защитного механизма. При этом следует отметить, что по окончании опыта, по сравнению с его началом адаптационный резерв оксидазно активных нейтрофилов существенно увеличился только у животных контрольной группы (401,72 %, $p < 0,05$), а у телят 2 и 3 групп установлена лишь тенденция к повышению числа таких клеток на 30,01 и 25,83 % соответственно. У телят 3 группы величина адаптационного резерва клеток обладающих оксидазной активностью после применения препаратов была достоверно ниже, чем у животных контрольной группы на 54,30 %. Коэффициент метаболической активации и показатель резерва оксидазной активности нейтрофилов у животных 1 группы после окончания опыта достоверно увеличились на 134,48 и 159,85 % по сравнению с началом опыта. У животных 2 и 3 групп это увеличение было незначительным, но достоверных межгрупповых различий по величине этих показателей не отмечено. Следовательно, ежедневное выпаивание в течение 7 суток пробиотика «Проваген» в дозе 14 г/гол не оказало

существенного влияния на адаптационный резерв нейтрофилов, обладающих оксидазной активностью, а совместное применение пробиотика в той же дозе с хитозаном (0,8 г/гол/сутки) вызвало снижение резерва этих клеток.

Индекс активации нейтрофилов крови у телят подопытных групп в базальных условиях существенно не различался как перед началом опыта, так и после его окончания.

Внесение в пробы крови зимозана выявило отсутствие достоверного увеличения индекса активации нейтрофилов крови у телят 1 группы перед началом опыта, но после окончания опыта величина этого показателя у животных 1 группы повысилась на 42,86 %, что свидетельствует о появлении у них резерва интенсивности оксидазной активности клеток. Выпаивание препаратов телятам 2 и 3 групп не оказало существенного влияния на индекс активации нейтрофилов крови в стимулированных зимозаном условиях.

Кислородонезависимая микробицидность нейтрофилов крови, определяемая по уровню в них катионных белков, у телят подопытных групп перед началом опыта была ниже нормативных значений. Ю.А.Мазинг [17] рассматривает катионные белки как комплекс – "антимикробные катионные белки" и относит к ним дефенсины, миелопероксидазу, эластазу, катепсин G, бактерицидный увеличивающий проницаемость белок, лактоферрин, лизоцим и фагоцитостимулирующий фактор. Их уровень практически не зависит от стимуляции клетки, а целиком определяется количеством вещества, синтезированного в процессе гранулопоэза. Так, у коров при микроэлементарной недостаточности цитохимический коэффициент (СЦК), характеризующий

уровень катионных белков, составлял 0,86 – 0,95 у здоровых животных от 1,29 до 1,48 [18].

После окончания опыта установлена тенденция к повышению уровня катионных белков в нейтрофилах телят 1 и 3 групп на 48,51 и 28,74% соответственно, а у животных 2 группы, которым выпаивали «Проваген» - достоверное повышение уровня катионных белков в нейтрофилах крови на 48,31% по сравнению с доопытным периодом.

В результате анализа проб крови животных подопытных групп, использованных во 2 опыте, установлено (табл. 2), что содержание лейкоцитов и относительного количества суммы нейтрофилов всех ядерных форм соответствовало наиболее высоким нормативным значениям, существенного влияния на эти показатели выпаивание препаратов не оказало.

Таблица 3. - Микробицидная активность нейтрофилов крови подопытных телят (2 опыт)

Показатели	После выпаивания препаратов		
	1 группа, n=5	2 группа, n=5	3 группа, n=5
Лейкоциты, 10^9 /л	10,69±1,35	8,60±0,13	9,72±0,68
Сумма нейтрофилов, %	33,58±6,29	31,53±5,09	34,38±3,58
+НСТ баз., %	6,90±1,96	9,10±2,54	9,90±1,93
+НСТ стим., %	55,70±2,92	48,30±3,68	50,70±2,78
ΔНСТ, %	48,80±4,33	39,20±3,39	40,80±4,15
ИАН баз.	0,08±0,02	0,11±0,03	0,09±0,01
ИАН стим.	0,67±0,05	0,54±0,04	0,60±0,03
К	0,87±0,04	0,82±0,04	0,79±0,04
ПР	11,21±0,92	6,62±1,30	6,93±2,61
СЦК	0,96±0,03	1,27±0,06*	1,42±0,22

Выпаивание телятам вдвое более высоких доз пробиотика и хитозана, чем в 1 опыте не оказало существенного влияния на кислородозависимую активность нейтрофилов крови телят опытных групп.

На уровень кислородонезависимой микробицидности доза «Провагена» 28 г/гол/сутки оказала более выраженное действие, чем 14 г/гол/сутки, что проявилось в более высоком содержании катионных белков в нейтрофилах крови телят 2 группы на 32,29% ($p < 0,05$) и животных 3 группы на 47,92% ($p > 0,05$) по сравнению с контролем.

Таким образом, ежедневное выпаивание в течение 7 суток пробиотика «Проваген» в дозе 14 г/гол и комплекса пробиотика (14 г/гол) с хитозаном (0,8 г/гол) оптимизировало гомеостаз, о чем свидетельствует выраженная тенденция к снижению до нормативных значений относительного содержания нейтрофилов в крови у телят.

Применение пробиотика «Проваген» в дозах 14 и 28 г/гол обусловило повышение кислородонезависимой микробицидности нейтрофилов крови у телят. При этом использование пробиотика при выращивании телят не оказало заметного влияния на оксидазную активность нейтрофилов крови, а выпаивание комплекса пробиотика (14 г/гол) с хитозаном (0,8 г/гол) обусловило снижение адаптационного резерва оксидазно активных нейтрофилов в крови.

Литература

1. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.- Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1989.- 344 с.
2. Смирнов В.В. Современные представления о механизме лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* // Микробиология. – 1993. – Т.55. – №4. – С. 34-35.
3. Фещенко В.М. Изучение влияния препарата ветом 4 и низкоинтенсивного лазерного излучения на поросят, больных гастроэнтеритом: Автореф. дис. канд. ветеринар. наук. – Троицк, 2003 – 18 с.
4. Ашихмин Д. Пробиотик "Проваген" - решение многих проблем при выращивании поросят // Свиноводство. - 2010. - № 3. - С. 46-47.
5. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие. / Под ред. А.П. Калашникова, В.И. Фисинина, В.В.Щеглова, Н.И. Клейменова: 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 2003. – 456 с.
6. Шубич М.Г., Нестерова И.В., Старченко В.М. Тест с нитросиним тетразолием в оценке иммунологического статуса детей с гнойно-септическими заболеваниями // Лаб. дело, 1980.- №7.- С. 342-344.
7. Шубич, М.Г., Медникова В.Г. НСТ-тест у детей в норме и при гнойно-бактериальных инфекциях // Лаб. дело, 1978. - № 1. - С.663-666.
8. Хаитов Р.Б., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995.-219 с.
9. Пахмутов И.А., Ульянова М.С. Оценка функциональной активности нейтрофилов крови животных // Ветеринария, 1984.- № 3.- С. 68-69.
10. Жибинов В.И. Применение лизосомально-катионного теста // Ветеринария, 1983.- № 8.- С. 30-31.
11. Макаревич Н.А. Лизосомально-катионный тест для оценки уровня резистентности организма крупного рогатого скота // Ветеринария, 1988.- № 5.- С. 26-28.
12. Плохинский, Н.А. Биометрия. - Из-во Сибирского отделения АН СССР, Новосибирск, 1961. – 362 с.
13. Карпуть, И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных // Минск: Ураджай, 1986.- 183 с.
14. Методы ветеринарно-клинической лабораторной диагностики: Справочник / И.П. Кондрахин, А.В. Архипов, В.И. Левченко и др.; Под ред. И.П. Кондрахина. – М.: КолосС., 2004. – 520 с.

15. Glasser L., Fiederlein R.L. Functional differentiation of normal human neutrophils // Blood, 1987.-v.69.- P.937-944.
16. Мазурик В.К., Михайлов В.Ф. О некоторых молекулярных механизмах основных радиобиологических последствий действия ионизирующего излучения на организм млекопитающих // Радиационная биология. Радиоэкология, 1999.- т.39.- №.1.- С.89-96.
17. Мазинг Ю.А. Нейтрофильные гранулоциты и системы защиты организма // Арх. патологии, 1991.- т.52.- № 9.- С.70-73.
18. Судаков Н.А, Береза В.И. Лизосомально-катионный тест неспецифической резистентности при микроэлементарной недостаточности у коров // Ветеринария, 1987.- № 1.- С.64-65.