



УДК 612.015.2:591.05:599.323.4:176

ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ І РІВЕНЬ КОРТИЗОЛУ В КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕСУ

С. С. Грабовський

*Львівський національний університет
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького
вул. Пекарська, 50, Львів 79010, Україна
e-mail: grbss@ukr.net*

Досліджували окремі показники клітинного імунітету й рівень кортизолу в крові щурів у разі використання імуномодуляторів рослинного і тваринного походження. У цільній крові визначали відносну кількість Т- і В-лімфоцитів та їх окремих популяцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана, проводили диференційований підрахунок розеткоутворюючих лімфоцитів із різним ступенем функціональної активності. Аерозольне введення екстракту селезінки до корму зміцнює рецепторний апарат клітин крові щурів: збільшує кількість загальних Т-лімфоцитів з низькою щільністю рецепторів, Т-лімфоцитів активних і Т-лімфоцитів хелперів “нульових”, порівняно з контролем. Додаткове введення щурам досліджуваних імуномодуляторів природного походження має стимулювальний вплив на кількість Т- і В-лімфоцитів і функціональну активність Т- і В-клітинного імунітету. У тварин, які з кормом отримували екстракт селезінки, встановлено вірогідно нижчий рівень кортизолу в крові порівняно з контролем, що може свідчити про зменшення стресу перед забоєм. Як імуномодулятори й антистресори поліаміни з екстракту селезінки мали найбільший вплив на деякі показники Т- і В- клітинного імунітету та на рівень кортизолу в крові лабораторних тварин перед їх забоєм. Результати, отримані нами у модельному експерименті на щурах, можуть бути використані у дослідженнях показників клітинного імунітету й концентрації стресових гормонів і, зокрема, кортизолу, на сільськогосподарських тваринах з метою підвищення резистентності організму, корекції та зняття впливу передзабійного (стресового) стану тварин.

Ключові слова: щури, передзабійний стрес, екстракти селезінки, ехінацеї та лимоннику китайського, пророщене зерно, Т- і В-лімфоцити, кортизол.

ВСТУП

Природний імунітет притаманний багатьом живим організмам, зокрема рослинам, комахам і навіть бактеріям, які мають захисні механізми проти вірусів-бактеріофагів. Специфічний (адаптивний) імунітет притаманний лише вищим твари-

нам – хордовим, і досягає найскладнішої організації у теплокровних тварин (птахів і ссавців). Природний імунітет діє швидко, тому що не залежить від клонального розмноження антиген-специфічних клітин, притаманних адаптивному імунітету, і, як правило, ефективно. Клітини природного імунітету відіграють важливу роль в адаптивному імунітеті — деякі з них (дендритні клітини) є антиген-презентувальними клітинами, що здатні до стимуляції антиген-специфічних клітин адаптивного імунітету (Т- і В-лімфоцитів) [20]. Із літературних даних відомо про вплив різного характеру стресів на Т- і В-клітинний імунітет [1, 7, 9–11, 19, 21, 22], механізм розвитку реакцій гомеостатичних систем на зовнішній подразник [8, 15].

У регулюванні імунного статусу важливу роль відіграють і поліаміни. Добре відомо, що поліаміни: спермідин, спермін і путресцин відіграють важливу роль у контролі вродженої імунної відповіді у вищих хребетних. Цей ефект поліамінів на клітинній імунній реакції пов'язаний з експресією генів. Поліаміни можуть сприяти розвитку відповідної адаптивної імунної реакції [12, 14, 18]. Поліаміни поглинаються Т- і В-лімфоцитами [21], регулюють апоптоз В-клітин при делеції клону [16]. В-лімфоцити ініціюють транспорт позаклітинних поліамінів [2]. У попередніх дослідженнях нами було встановлено високий вміст поліамінів в екстракті селезінки [4], що дало нам змогу використати цей субстрат як імуномодулятор і з'ясувати його дію ще й як антистресора.

Поряд зі збалансованою годівлею й належним утриманням тварин, важливим завданням є підвищення резистентності та зміцнення імунітету, зокрема у стресовому стані – перед забоєм тварин. У літературі недостатньо висвітлені питання про вплив передзабійного (стресового) стану тварин на окремі показники імунітету й концентрацію стресових гормонів і, зокрема, кортизолу. Оскільки передзабійний стан є стресовим для тварини, в гіпоталамусі активно відбувається секреція рилізинг-гормону (кортикотропін-рилізинг-фактор), що призводить до підвищення рівня адренкортикотропного гормону, який, у свою чергу, стимулює секрецію кортизолу та інших стресових гормонів наднирників. Тому збільшення рівня цього гормону в крові свідчить про стресовий стан у тварин. Наші дослідження на щурах були модельними, і їх можна використати у подальших дослідженнях на сільськогосподарських тваринах. Але слід пам'ятати, що перед забоєм сільськогосподарських тварин не можна використовувати препарати, які мають негативний вплив на організм людини після споживання продукції від цих тварин. Саме тому в дослідженнях ми використали біологічно активні речовини природного походження: екстракти селезінки, ехінацеї та лимоннику, а також пророщене зерно. Метою роботи було встановити, якими саме речовинами можна підвищити резистентність і зміцнити імунітет сільськогосподарських тварин при одночасному зменшенні передзабійного стресу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на білих статевозрілих самках лінії Вістар лабораторних щурів масою тіла 180–220 г, які утримувались у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення темнота/світло при температурі 20–22 °С, необмеженим доступом до питної води та корму. Щурам згодовували стандартний брикетований комбікорм для лабораторних тварин. Для досліджень було сформовано чотири групи (три дослідні (I, II і III) та контрольну (IV)) по п'ять щурів у кожній. Як біологічно активні речовини (за п'ять днів до забою тварин) використовували екстракт селезінки (I), екстракти ехінацеї та лимоннику (II), пророщене зерно (III) — як антистресори й імуномодулятори у передзабійний період. Екстракти

на 70 ° спиртовому розчині наносили на корм аерозольним розпиленням в об'ємі 0,6 мл/тварину. Тваринам контрольної групи (IV) таким же чином додавали до корму 70 ° спиртовий розчин в аналогічному об'ємі. Щурам усіх груп додатково до стандартного корму давали зерно (10 г/тварину). Поїдання корму контролювали щоденно. У кінці досліду всіх тварин декапітували почергово під етерним наркозом. Кров від щурів брали у ділянці декапітації.

Під час експерименту всі біоетичні норми 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) та дотриманням принципів гуманності, викладеними у директиві Європейської Спільноти [17], були збережені.

У цільній крові щурів визначали відносну кількість Т- і В-лімфоцитів та їх окремих популяцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана як маркерами. Принцип методу полягає у здатності лімфоцитів утворювати так звані "розетки" з гетерогенними еритроцитами. У центрі "розетки" є лімфоцит, на мембрані якого містяться специфічні рецептори, а по периферії еритроцити. За кількістю еритроцитів, адсорбованих одним лімфоцитом, судять про ступінь активності лімфоцитів. Визначали відносну кількість загальних (ТЕ-РУЛ – загальні розеткоутворюючі лімфоцити) й 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 щурів. Зроблені мазки висушували, фіксували метанолом, фарбували 7–10 хв за Романовським-Гімзою. Мікроскопію мазків робили під імерсією при збільшенні 90 × 7. Лімфоцити розрізняли за кількістю приєднаних еритроцитів: нульові – не приєднали жодного, малодиференційовані (низькоавідні лімфоцити 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).

Визначення відносної кількості теофілінрезистентних Т-хелперів ґрунтується на тому, що ці клітини несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу М, а Т-супресори – до імуноглобулінів класу G. Хелперні — лімфоцити, здатні формувати розетки після їх інкубації з теофіліном – це теофілінрезистентні клітини. Кількість теофілінчутливих лімфоцитів Т-супресорів визначали за різницею між кількістю ТЕ-РУЛ і Т-хелперів.

Визначали відносну кількість В-лімфоцитів, метод ідентифікації яких ґрунтується на наявності у них мембранних імуноглобулінових 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 і комплементом. Для приготування комплемент-антиген-комплексу використовували готову рідку гемолітичну сироватку (титр 1:1 200) та готовий сухий комплемент морської свинки.

У плазмі крові щурів визначали кортизол за стандартною методикою. Принцип методу: соліднофазний ферментозв'язаний імуносорбційний набір, створений за принципом конкуренції. Лунки на мікропланшетці вкриті моноклональним антитілом проти антигенів молекул кортизолу. Зразок плазми (сироватки) крові з ендogenousним кортизолом інкубується у лунці разом із ензимним кон'югатом. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається водою. Кількість зв'язаної пероксидази

обернено пропорційна концентрації кортизолу у зразку. Після додавання субстрату інтенсивність забарвлення, що утворюється, обернено пропорційна концентрації кортизолу в досліджуваному зразку [24].

З метою порівняння концентрації кортизолу у крові щурів контрольної та дослідних груп, оцінки наявності впливу стресу на рівень цього гормону у крові всіх тварин, а також щільності кореляційного зв'язку, ми застосували дисперсійний аналіз. Для забою щурів брали з клітки почергово від першої до останньої тварини. Для кожної із дослідних груп, для контрольної групи і загалом для усіх піддослідних тварин розраховували середнє значення, дисперсію, середнє квадратичне відхилення, квадратичний коефіцієнт варіації, а також середню із внутрішньогрупових дисперсій, міжгрупову дисперсію рівня кортизолу у крові тварин і кореляційне відношення.

Математичну обробку результатів деяких показників імунітету тварин опрацьовували статистично за допомогою пакету програм Statistica 6.0 і Microsoft Excel for Windows XP. Вірогідність різниць оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Результати вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Важливого значення при дослідженні показників імунітету тварин надається визначенню кількості Т- і В-лімфоцитів як провідних імунокомпетентних клітин крові, які характеризують рівень захисних сил організму і стан специфічного (адаптивного) імунітету.

Аналізуючи результати досліджень окремих показників імунного статусу організму, встановили більшу кількість загальних Т-лімфоцитів із низькою щільністю рецепторів (3–5) у крові щурів усіх дослідних груп: I дослідна – на 8,5 % ($P < 0,01$); II дослідна – на 6,92 % ($P < 0,01$) і III дослідна група – на 5,25 % ($P < 0,05$); Т-лімфоцитів активних – на 7 % ($P < 0,01$) і Т-лімфоцитів хелперів “нульових” 6,25 % ($P < 0,01$) – лише у крові щурів I дослідної групи порівняно з контролем (табл. 1).

Отримані нами дані подібні до результатів досліджень деяких авторів [5], які повідомляють, що випоювання бройлерам як самого настою з евкалипту, так і з додаванням вітаміну С мало стимулювальний вплив на активність Т-В-клітинної ланки імунітету; що кількість Т-лімфоцитів (загальних, активних, теофілін-резистентних) і В-лімфоцитів у крові гусенят та індичат, яким додатково до раціону вводили вітамін Е, була більша ніж у контролі.

Деякі автори [13] виявили, що у крові індичат і гусенят дослідних груп є вища функціональна активність імунокомпетентних клітин за рахунок перерозподілу авідності рецепторного апарату Т- і В-лімфоцитів, а саме збільшення кількості лімфоцитів із низькою та середньою щільністю рецепторів і зменшення недиференційованих у функціональному відношенні клітин. Констатовано стимулювальний вплив токоферолу на бластогенез Т-лімфоцитів крові індичат і гусенят дослідних груп.

У результаті проведених нами досліджень (табл. 1) встановлено зменшення Т-лімфоцитів-хелперів (з низькою щільністю рецепторів) у щурів II та III дослідних груп, відповідно: на 8,92 % ($P < 0,05$) та на 4 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Збільшення відсотка Т-супресорів у крові щурів II дослідної групи 7,92 % ($P < 0,01$) вказує на зменшення кількості В-клітин і синтез антитіл, через зменшення трансформації плазматичних В-лімфоцитів у плазматичні клітини.

Кількість В-лімфоцитів вірогідно більша у крові тварин I дослідної групи за рахунок “нульових” мало диференційованих у функціональному відношенні клітин

61,0±2,94, що на 11,5 % (P<0,05) більше порівняно з контролем. Слід відмітити зменшення загальної кількості В-лімфоцитів на 11,5 % (P<0,05) у крові тварин I дослідної групи за рахунок клітин зі середньою (6–10) 6,5±2,38 (P<0,01) та високою (M) 3,0±1,83 (P<0,01) щільністю рецепторів порівняно з тваринами контрольної групи.

Таблиця 1. Кількість Т- і В-лімфоцитів і їх функціональна активність у крові щурів (M±m; n =5)

Table 1. Amount T- and B-lymphocytes and their functional activity in rat's blood (M±m; n = 5)

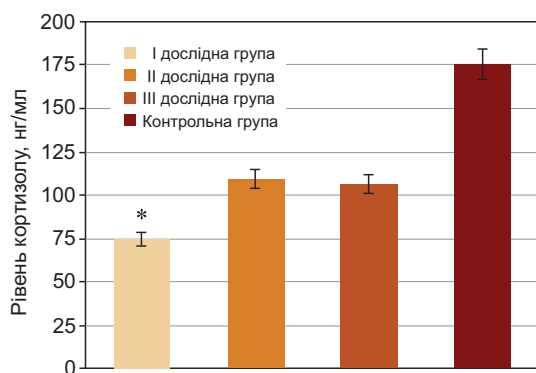
Показники	Групи тварин			
	I Дослідна	II Дослідна	III Дослідна	Контрольна
Т-загальні (ТЕ–РУЛ), 0	54,25±7,59	55,67±4,16	55,75±4,23	60,75±1,5
3–5	38,25±6,02**	36,67±0,58**	35,0±2,0*	29,75±2,87
6–10	5,75±3,30	6,0±2,65	6,0±1,41	6,5±1,92
M	1,75±1,26	1,67±1,56	3,25±2,22	3,0±2,58
%	45,75±4,92**	44,33±4,16	44,25±4,43	39,25±1,5
Т-активні (ТА–РУЛ), 0	76,5±1,92**	72,67±4,04	70,5±3,79	69,5±3,87
3–5	23,25±4,57	22,0±2,0	22,5±1,92	23,75±2,63
6–10	2,75±2,87	4,33±1,53	4,0±1,16	4,25±1,71
%	26,0±3,46	27,33±4,04	27,0±1,63	28,0±1,83
Т-теофілінрезистентні (Th–РУЛ), 0	75,0±3,27**	71,33±4,62	72,25±2,87	68,75±2,5
3–5	23,5±3,11	18,33±2,08*	23,25±1,89*	27,25±0,96
6–10	3,5±1,29	6,0±1,73	3,0±1,14	4,0±2,16
M	0,5±0,56	1,0±1,0	1,5±1,29	0,0±0,0
%	27,5±3,0	25,33±1,16*	27,75±2,87	31,25±2,5
Ts %	14,5±4,73	19,67±3,06**	16,5±5,69	11,75±3,5
В-РУЛ (ЕАС-РУЛ), 0	61,0±2,94*	54±3,01	55,25±5,5	49,5±4,44
3–5	29,5±2,52	31,67±3,22	34,75±4,11	33,0±3,37
6–10	6,5±2,38**	9,67±0,58	9,5±1,29	10,25±1,71
M	3,0±1,83**	4,33±2,89	3,0±4,0	7,25±2,5
%	39,0±2,94*	45,67±3,75	47,25±4,86	50,5±4,44

Примітка: статистична вірогідність різниць: * – P<0,05; ** – P<0,01 порівняно з контролем.

Comment: statistical probability of the differences: * p <0.05, ** p <0.01 compared to control.

Із цих даних випливає, що додавання до корму екстракту селезінки щурам першої дослідної групи в основному впливає на функціональні властивості Т-лімфоцитів крові, зокрема зміцнює рецепторний апарат клітин.

Ми провели модельний експеримент на щурах для визначення показників клітинного імунітету і концентрації кортизолу – стресового гормону, як деякі автори у своїх дослідженнях [5, 23]. Відмінністю було те, що ми враховували тільки передзабійний стрес. Ці дослідження можна перенести на сільськогосподарські тварини з метою підвищення резистентності організму, корекції та зняття впливу стресу перед забоем тварин.



У плазмі крові щурів, які додатково з кормом отримували екстракт селезінки (I дослідна група), рівень кортизолу був вірогідно нижчим ($P < 0,05$) порівняно з тваринами контрольної групи (IV), що може свідчити про зменшення стресу перед забоєм (рис. 1).

Рис. 1. Рівень кортизолу у плазмі крові щурів перед забоєм, нг/мл

Fig. 1. Cortisol level in rats blood plasma pre-slaughter, ng/ml

Така ж тенденція спостерігалась і у плазмі крові щурів, яким додавали екстракти ехінацеї та лимоннику (II дослідна група), а також пророщене зерно (III дослідна група). Ці результати краще ілюструються, коли розглядати зміни рівня кортизолу кожної тварини зокрема. Рівень кортизолу у тварин I дослідної групи коливався у діапазоні від 15,8 нг/мл (тварина, яку з клітки брали першою) до 156,3 нг/мл (тварина, яку з клітки брали п'ятою). У тварин контрольної групи концентрація кортизолу становила 121,9 і 215,0 нг/мл, відповідно. Подібна динаміка, як у тварин I дослідної груп, спостерігається нами у щурів II та III дослідних груп, залежно від порядку взяття тварини з клітки (рис. 2).

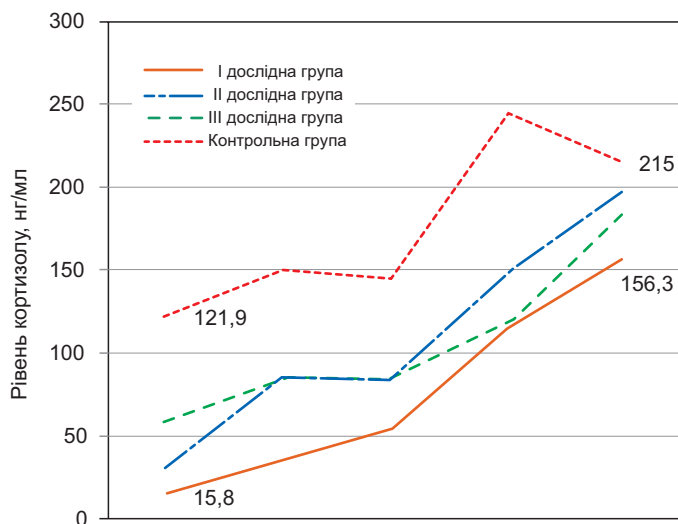


Рис. 2. Рівень кортизолу у щурів залежно від порядку взяття з клітки, нг/мл

Fig. 2. Cortisol level of rats depending on taking from a cage, ng/ml

За значеннями середніх квадратичних відхилень (табл. 2) не можна стверджувати про існування певної закономірності щодо однорідності дослідних груп стосовно середнього рівня кортизолу у групах тварин.

У той же час, беручи до уваги значення квадратичних коефіцієнтів варіації, які від першої групи до контрольної стають меншими, можна зробити висновки про певну закономірність: від першої тварини у клітці до останньої простежується не просто зростання концентрації показника, а з кожною групою – дедалі вища однорідність сукупності, на що вказує квадратичний коефіцієнт варіації.

Таблиця 2. Результати дисперсійного аналізу рівня кортизолу у плазмі крові щурів
Table 2. Dispersion analysis of cortisol in rat's blood plasma

Показники	Групи тварин			
	Дослідні групи			Контрольна
	I	II	III	
Середнє значення, нг/мл	75,0	109,0	106,0	174,9
Дисперсія	2772,9	3321,7	1865,6	2162,7
Середнє квадратичне відхилення, нг/мл	52,6	57,6	43,2	46,5
Квадратичний коефіцієнт варіації, %	70,2	52,9	40,7	26,6

Для виявлення взаємозв'язку між згодовуванням щурам екстрактів тваринного і рослинного походження та рівня кортизолу нами застосовано один із статистичних методів оцінювання щільності кореляційного зв'язку за даними групування, а саме використано таку міру щільності зв'язку як кореляційне відношення $\eta^2 = \frac{\delta^2}{\sigma^2}$, де δ^2 – міжгрупова дисперсія, яка вимірює варіацію залежної ознаки під впливом фактора, а σ^2 – загальна дисперсія. У нашому випадку кореляційне відношення η^2 дає змогу оцінити наявність і силу впливу згодовування екстрактів рослинного й тваринного походження на рівень кортизолу в крові від першої до останньої тварини у клітці.

За даними дослідних груп: I дослідна група (додавання до основного раціону тварин екстракту селезінки), II дослідна група (додавання екстрактів ехінацеї та лимоннику), III дослідна група (додавання до раціону пророщеного зерна), нами розраховано загальну дисперсію ($\sigma^2 = 3855,4$), середню з внутрішньогрупових ($\bar{\sigma}_i^2 = 2530,7$) та із формули взаємозв'язку між трьома дисперсіями – правила складання дисперсій $\sigma^2 = \delta^2 + \bar{\sigma}_i^2$ розраховано міжгрупову дисперсію ($\delta^2 = 1324,7$).

Отримане нами значення кореляційного відношення (коефіцієнта детермінації) $\eta^2 = 0,344$ свідчить про те, що зміна рівня кортизолу в крові на 34,4 % залежить від зміни значення груповальної ознаки – при додаванні до основного раціону екстракту селезінки (I дослідна група), екстрактів ехінацеї та лимоннику (II дослідна група), а також пророщеного зерна (III дослідна група). Значення коефіцієнта кореляції $\eta = 0,586$ вказує на існування помітного (середнього) кореляційного зв'язку між зміною рівня кортизолу та факторною ознакою.

Нами проведено перевірку істотності кореляційного зв'язку, яка ґрунтується на порівнянні фактичного значення h^2 з критичним, яке могло би виникнути за відсутності зв'язку. Якщо фактичне значення h^2 перевищує критичне, то зв'язок між ознаками не випадковий. Гіпотеза, що перевіряється, формулюється як нульова: $H_0 : \eta^2$. Критичне значення кореляційного відношення для рівня істотності $\alpha = 0,05$ і відповідного числа ступенів свободи $k_1 = m - 1 = 3 - 1 = 2$ (m – число груп) і $k_2 = n - m = 21 - 3 = 18$ (n – обсяг сукупності) становить $\eta_{0,95}^2 = (2,18) = 0,283$ [3]. Розраховане нами кореляційне відношення $h^2 = 0,344$ перевищує критичне, а отже, гіпотеза про випадковий характер відхилень групових середніх відхиляється. Зв'язок між додаванням до основного раціону тварин екстрактів тваринного і рослинного походження та рівнем кортизолу з імовірністю 0,95 визнається істотним.

ВИСНОВКИ

1. Додаткове введення щуром усіх досліджуваних імуномодуляторів природного походження має стимулювальний вплив на кількість і функціональну активність Т- і В-клітинної ланки імунітету: збільшення кількості загальних Т-лімфоцитів із низькою щільністю рецепторів у крові щурів усіх дослідних груп.
2. У крові тварин, які з кормом отримували екстракт селезінки, була більша кількість Т-лімфоцитів активних, Т-лімфоцитів хелперів “нульових” і вірогідно нижчий рівень кортизолу порівняно з контролем.
3. Поліаміни з екстракту селезінки, як імуномодулятори й антистресори, мали найбільший вплив на показники Т- і В-клітинного імунітету та на рівень кортизолу в крові лабораторних тварин перед їх забоєм.
4. Проведений статистичний аналіз результатів дослідів у контрольних і дослідних групах тварин на основі квадратичних коефіцієнтів варіації вказує на зростання рівня однорідності дослідних груп, а отже, на позитивний вплив додавання до основного раціону екстрактів селезінки, ехінацеї, лимонника та пророщеного зерна.
5. Результати оцінки щільності кореляційного зв'язку, зокрема отримані значення коефіцієнтів кореляції та детермінації, підтверджують висновки про суттєвий вплив згодовування екстрактів рослинного і тваринного походження на рівень кортизолу в крові тварин.

1. *Chernushenko E.F.* Local immunity: diagnostics of its violations and possibility of correction. **Art of Treatment**, 2007; 7(43): 61–67. (In Russian).
2. *De Benedette M., Olson J.W., Snow E.C.* Expression of polyamine transporter activity during B-lymphocyte cell cycle progression. **The Journal of Immunology**, 1993; 150(10): 4218–4224.
3. *Gerasimenko S.S., Golovach A.V., Erina A.M.* et al. **Statistics: Textbook**. Sciences edited by d-r economic of sciences of S. S. Gerasimenko. It is a 2nd edition, complemented. K.: KNEU, 2000: 110–113.
4. *Grabovskyi S.S.* Extracting of biologically active substances of spleen with the application an ultrasound. **Proceedings SWorld**. Ivanovo: MARKOVAA. D., 2013; 4(49): 3–6. (In Russian).
5. *Groer, M., Wolfe, S., Park, C.R.* Reduction of hair glucocorticoid levels in an animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Brain, Behavior, and Immunity**, 2013; 68(32): 20.
6. *Gunchak A.V., Ratuch I.B., Kaminska M.V.* Composition of cecum microflora and indices of cellular immunity in broiler chickens under the action of phytomedication. **The Animal Biology**, 2012; 14(1–2): 518–523. (in Ukrainian).
7. *Herbert T. B., Sheldon C.* Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. **Psychosomatic Medicine**, 1993; 55(4): 364–379.
8. *Kaminska M.V., Nechay H.I., Tsepko N.I., Kolisnyk H.V.* Influence carotenecontaining yeast biomass and β -carotene on the microfloras composition and immune status of rats. **The Animal Biology**, 2008; 10(1–2): 261–265. (in Ukrainian).
9. *Kuzmenko O.V.* Daily rhythm of immune system indexes rats and radio sensitivity. **Experimental and Clinical Medicine**, 2011; 1(50): 132–141. (in Ukrainian).
10. *Kyseleva N.M., Kuzmenko L.H. Nkane Nkoza M.M.* Stress and lymphocytes. **Paediatrics**, 2012; 91(1): 137–143. (In Russian).
11. *Marvar P.J., Vinh A., Thabet S.* et al. T lymphocytes and vascular inflammation contribute to stress-dependent hypertension. **Biological Psychiatry**, 2012; 71(9): 774–782.
12. *Maslyanko R.P., Grabovskyi S.S., Grabovska O.S.* Modern notion of phagocytosis. **The Animal Biology**, 2013; 15(3): 63–69. (in Ukrainian).

13. *Mudrak D.I., Vishchur O.I., Broda N.A.* et al. State T- and B-cell immunity in parts of turkeys and geese for various levels of vitamin E the diet. **The Animal Biology**, 2012; 14(1–2): 535–539. (in Ukrainian).
14. *Naduge M., Didac C-G., Frank M.* Polyamines in aging and disease. **AGING**, 2011; 3(8): 1–16.
15. *Nezhinskaja G.I., Petrova N.N.* Role of B-lymphocytes incentive in prevention of stress-inducible stomach ulcers in Wistar rats. **Cytokines and Inflammation**, 2006; 5(1): 34–36. (In Russian).
16. *Nitta T., Igarashi K., Yamashita A.* et al. Involvement of Polyamines in B Cell Receptor-Mediated Apoptosis: Spermine Functions as a Negative Modulator. **Experimental Cell Research**. 265.1 (2001): 174–183.
17. **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.
18. *Reyes-Becerril M., Ascencio-Valle F., Tovar-Ramirez D.* et al. Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes. **Fish Shellfish Immunol**, 2010; 30: 248–254.
19. *Roitt I.* **Essential Immunology**. Oxford: Blackwell Scientific Publicatione, 2001; 438 p.
20. *Romanyuk S.I., Komisarenko S.V.* Immunity: what do force its to work? **Visnyk of National Academy of Sciences**, 2012; 1: 49–54. (in Ukrainian).
21. *Salyha N.* T- and B-cells immunity at the condition introduction L-glutamic acid. **Visnyk of Lviv Univ. Biology Series**, 2012; 58: 80–84. (in Ukrainian).
22. *Takahashi A., Hanson M.G.V., Norell H.R.* et al. Preferential Cell Death of CD8⁺ Effector Memory (CCR7⁻ CD45RA⁺) T Cells by Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. **The Journal of Immunology**, 2005; 174: 6080–6087.
23. *Vachon-Pressseau E., Roy M., Martel M.O.* et al. The stress model of chronic pain: evidence from basal cortisol and hippocampal structure and function in humans. **Brain**, 2013; 136(3): 815–827.
24. *Vlizlo V.V., Fedoruk R.S., Ratych I.B.* et al. Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary: **Reference Book**; Edited by V.V. Vlizlo. Lviv: SPOLOM, 2012, 764 p. (in Ukrainian).

EFFECT OF NATURAL IMMUNOMODULATORS INFLUENCE ON CELLULAR IMMUNITY INDICES AND CORTISOL LEVEL IN RAT'S BLOOD AT PRE-SLAUGHTER STRESS

S. S. Grabovskyi

*Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyj
50, Pekarska St., Lviv, 79010, Ukraine
e-mail: grbss@ukr.net*

Cellular immunity indices and cortisol level in rat's blood after using of plant and animal origin immunomodulator were studied. Relative amount of T- and B-lymphocytes and their populations in the reaction of spontaneous rosetting with the ram erythrocytes in was determined blood. Differentiated count of rosetting lymphocyte with the different functional activity degree was conducted. Aerosol introduction of spleen extract to the rats feed strengthens the cells receptor apparatus of rat's blood cells: increases the amount of total T-cell low-density receptors, T-cell active and T-cell of "zero" helpers, compared to control T- and B-lymphocytes number and functional activity T- and B-cell immunity was stimulated after additional supplementary of rat's diet with experimental natural immunomodulators. Cortisol level in rat's blood was reliable lower compared to

control that caused decreasing pre-slaughter stress. Spleen extract polyamines as the immunomodulators and antistressors most effectively influenced some T- and B-cell immunity indices and cortisol level in rat's blood before slaughter. The results obtained in model experiment can be used in studies of cell immunity indices and stress hormones, such as cortisol, on farm animals for organism resistance increasing and correction of their pre-slaughter stress.

Keywords: rats, for pre-slaughter stress, spleen, Echinacea and *Schizandra chinensis*, extracts, growing grain, T- and B-lymphocytes, cortisol

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА И УРОВЕНЬ КОРТИЗОЛА В КРОВИ КРЫС В СОСТОЯНИИ СТРЕССА

С. С. Грабовский

*Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий
имени С. З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, Львов 79010, Украина
e-mail: grbss@ukr.net*

Исследовали отдельные показатели клеточного иммунитета и уровень кортизола в крови крыс при использовании иммуномодуляторов растительного и животного происхождения. В цельной крови определяли относительное количество Т- и В-лимфоцитов и их отдельных популяций в реакции спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана. При этом проводили дифференцированный подсчет розеткообразующих лимфоцитов с разной степенью функциональной активности. Аэрозольное введение экстракта селезенки в корм крысам укрепляет рецепторный аппарат клеток крови крыс: увеличивает количество общих Т-лимфоцитов с низкой плотностью рецепторов, Т-лимфоцитов активных и Т-лимфоцитов хелперов “нулевых”, в сравнении с контролем. Дополнительное введение к корму крыс иммуномодуляторов естественного происхождения имеет стимулирующее влияние на количество Т- и В-лимфоцитов и функциональную активность Т- и В-клеточного звена иммунитета. У животных, которые с кормом получали экстракт селезенки, уровень кортизола в крови был достоверно ниже в сравнении с контролем, что свидетельствовало об уменьшении стресса перед убоем. В качестве иммуномодуляторов и антистрессоров полиамины из экстракта селезенки имели наибольшее влияние на некоторые показатели Т- и В-клеточного иммунитета и на уровень кортизола в крови крыс перед их убоем. Результаты, полученные нами в модельном эксперименте на крысах, могут использоваться в исследованиях показателей клеточного иммунитета и концентрации стрессовых гормонов и, в частности, кортизола, на сельскохозяйственных животных с целью повышения резистентности организма, коррекции и снятия влияния передубойного (стрессового) состояния животных.

Ключевые слова: крысы, передубойный стресс, экстракты селезенки, эхинацеи и лимонника китайского, проросшее зерно, Т- и В-лимфоциты, кортизол.

Одержано: 05.02.2014