

ДИНАМІКА ФАГОЦИТАРНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ОКСИДАЦІЙНОГО СТРЕСУ ТА ДІЇ ЛІПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ

М. І. Харів, Б. В. Гутий
chariv_ii@ukr.net

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

У статті наведено результати досліджень впливу розробленого комплексного ліпосомального препарату на динаміку показників неспецифічної ланки природної резистентності у щурів за змодельованого оксидативного стресу, який викликали застосуванням тетрахлорметану.

Доведено, що внутрішньом'язова ін'єкція щурам дослідних груп 50 % олійного розчину тетрахлорметану у дозі 0,25 мл на 100 г маси тіла тварини зумовлює антигенне навантаження на організм та призводить до пригнічення неспецифічної ланки природної резистентності. На це вказує зниження показників фагоцитарної активності нейтрофілів у крові уражених тварин впродовж усього періоду досліджень. На 14-ту добу показник фагоцитарної активності нейтрофілів становив 42,6 % проти 48,9 % контрольної групи тварин. Поряд із цим, виявили зниження величини фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа крові щурів на 2-, 5-, 10-у доби досліджень. На 14-у добу досліду ці показники у крові щурів дослідної групи, яким вводили тетрахлорметан, були низькими: величина фагоцитарного індексу — на 38 %, а фагоцитарного числа — на 18 % від показників контрольної групи щурів.

Для стимуляції неспецифічної ланки природного імунітету організму щурів за оксидативного стресу доцільно застосовувати ліпосомальний препарат, до складу якого входять бутафосфан, інтерферон, плоди розторопші плямистої та вітаміни. Після застосування ліпосомального препарату щурам за умов оксидативного стресу впродовж досліджень відновлюється неспецифічна ланка природного імунітету, а саме відсутні відхилення від норми показників фагоцитарної активності нейтрофілів, фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа крові. На 14-у добу досліду показники неспецифічної ланки імунітету щурів, яким застосовували ліпосомальний препарат, коливалися у фізіологічних межах.

Ключові слова: ОКСИДАЦІЙНИЙ СТРЕС, НЕСПЕЦИФІЧНА ЛАНКА ІМУНІТЕТУ, ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ, ФАГОЦИТАРНИЙ ІНДЕКС, ФАГОЦИТАРНЕ ЧИСЛО, ЩУРИ, ЛІПОСОМАЛЬНИЙ ПРЕПАРАТ, БУТАФОСФАН, ІНТЕРФЕРОН, РОЗТОРОПША ПЛЯМИСТА, ВІТАМІНИ

DYNAMICS OF PHAGOCYtic ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN RATS UNDER OXIDATIVE STRESS AND THE ACTION OF LIPOSOMAL PREPARATION

M. Khariv, B. Gutyj
chariv_ii@ukr.net

Lviv national university of veterinary medicine and biotechnologies named after S. Z. Gzhytsky,
50 Pekarska str., Lviv 79010, Ukraine

The article deals with the researches results of the developed complex liposomal preparation influence on dynamics of nonspecific level of natural resistance in rats under modeled oxidative stress caused with the use of carbon tetrachloride.

It is proved that intramuscular injection to rats in the experimental group 50 % of oil solution of tetra chloromethane at a dose of 0.25 ml per 100 g of animal body weight determines the antigenic load on the body and causes nonspecific inhibition level of natural resistance. This is indicated with decrease in phagocytic activity of neutrophils in the blood of infected animals during the entire research period. On the 14th day the indices of phagocyte activity of neutrophils was 42.6 % against 48.9 % in the control group of animals. Alongside with this reduction of values it was found phagocyte index and phagocyte number of blood among rats on the 2nd, 5th and 10th day of research. On the 14th day of the experiment, these indicators in biological object of rat blood of the 1st experimental group were low: accordingly, the value of phagocyte index by 38 % and phagocyte number — 18 %

from indicators of the rat organism by oxidative stress.

It is advisable to apply the liposomal preparation containing butafosfan, interferon, milk thistle and vitamins. After using liposomal preparation to rats, under oxidative stress during researches, equilibrium level of nonspecific natural resistance is restored in the blood, namely no abnormal parameters of phagocyte activity of neutrophils, phagocyte index and phagocyte number of blood. On the 14th day of experiment the indices of non-specific link of the immune system in the blood of rats varied within the physiological limits.

Keywords: OXIDATIVE STRESS, LIPOSOMAL PREPARATION, PHAGOCYTE ACTIVITY, EUTROPHILS, MILK THISTLE, RATS BODY, IMMUNE SYSTEM, LIPOSOMAL PREPARATION, BUTAFOSFAN, INTERFERON, MILK THISTLE, VITAMINS

ДИНАМИКА ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА

М. И. Харив, Б. В. Гутьий
chariv_ii@ukr.net

Львовский национальный университет ветеринарной медицины
и биотехнологий имени С. З. Гжицкого,
ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

В статье приведены результаты исследований влияния разработанного комплексного липосомального препарата на динамику показателей неспецифического звена естественной резистентности у крыс при смоделированном оксидативном стрессе, который вызвали применением тетрахлорметана.

Доказано, что инъекция крысам опытных групп 50 % масляного раствора тетрахлорметана в дозе 0,25 мл на 100 г массы тела животного вызывает антигенную нагрузку на организм и приводит к подавлению неспецифического звена естественной резистентности. На это указывает снижение показателей фагоцитарной активности нейтрофилов в крови пораженных животных в течение всего периода исследований. На 14-е сутки показатель фагоцитарной активности нейтрофилов составил 42,6 % против 48,9 % у контрольной группы животных. Наряду с этим, выявлено снижение величины фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа крови крыс на 2-, 5-, 10-ю сутки исследований. На 14-й день опыта эти показатели в крови крыс опытной группы, которым вводили тетрахлорметан, были ниже: соответственно, величина фагоцитарного индекса — на 38 %, а фагоцитарного числа — на 18 % от показателей крыс контрольной группы.

Для стимуляции неспецифического звена естественного иммунитета организма крыс при оксидативном стрессе целесообразно применять липосомальный препарат, который в своем составе содержит бутафосфан, интерферон, плоды расторопши пятнистой и витамины. После применения липосомального препарата крысам в условиях оксидативного стресса в течение исследований восстанавливается неспецифическое звено естественного иммунитета, а именно, отсутствуют отклонения от нормы показателей фагоцитарной активности нейтрофилов, фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа крови. На четырнадцатые сутки опыта показатели неспецифического звена иммунитета крыс, которым применяли липосомальный препарат, колебались в физиологических пределах.

Ключевые слова: ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС, НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ЗВЕНО ИММУНИТЕТА, ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ, ФАГОЦИТАРНЫЙ ИНДЕКС, ФАГОЦИТАРНОЕ ЧИСЛО, КРЫСЫ, ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ, БУТАФОСФАН, ИНТЕРФЕРОН, РАСТОРОПША ПЯТНИСТАЯ, ВИТАМИНЫ

На сьогодні найбільшою проблемою у тваринництві є зниження імунобіологічної реактивності у постнатальний період розвитку. Антропогенні чинники дестабілізують метаболічні процеси в організмі, призводять до зниження природної резистентності, імуно-

дефіциту і в окремих випадках — до загибелі [3, 4]. Відповідно до сучасних досліджень встановлено, що стійкість організму тварин до захворювань здійснює імунна система, головною функцією якої є розпізнавання та знешкодження чужорідних речовин для підтримання

стабільності генетичного гомеостазу організму. Серед багатьох факторів, які негативно впливають на імунну систему, протеїнсинтезувальну та ензимну функцію печінки тварин, важливе місце займають різні імунодепресанти, які пригнічують вищезгадані функції [7]. За цих умов розвивається імунодефіцитний стан. Власне тому організм може уражатися вторинною бактеріальною або вірусною інфекціями [5, 11, 13]. Для підвищення адаптаційної здатності й імунобіологічної реактивності організму, посилення протеїнсинтезувальної та ензимної функції тварин в останні роки успішно застосовують нові комплексні препарати [1, 2, 10, 15]. Окремими авторами встановлено стимулювальний вплив бутафосфану, розторопші, вітамінів на активність імунної, антиоксидантної та гепатопротекторної дії у тварин [6, 9, 18]. Однак метаболічна дія цих препаратів на імунну систему у науковій літературі висвітлена недостатньо. Зокрема, не вивчено динаміку фагоцитарної активності нейтрофілів у щурів за дії ліпосомального препарату. Фагоцитарна активність нейтрофілів (ФА) відображає здатність нейтрофільних гранулоцитів фагоцитувати чужі для організму антигени — бактерії, клітини або лейкоцити, що загинули. Ця функція забезпечується завдяки активності опсонізуючих факторів крові — антитіл і комплемента. Фагоцитоз — це складний багатостадійний процес, який здійснюють макрофаги і моноцити крові, клітини пульпи селезінки, клітини Купфера печінки та мікрофаги, тобто гранулоцити крові. Це перша фаза специфічної імунної реакції організму на дію антигенів. За цих умов настає видозміна антигена з утворенням пептидних молекул у формі антигенних детермінантів, що посилює імуногенез і забезпечує тривале збереження імуногенів на поверхні клітин. Фагоцитарна активність нейтрофілів забезпечує збереження оптимального гомеостазу організму. Її стан оцінюють за фагоцитарним індексом (ФІ) — кількістю мікроорганізмів, що захоплює один активний фагоцит, та за фагоцитарним числом (Фч) — кількістю фагоцитованих мікробних тіл на 100 підрахованих лейкоцитів [8].

Наведене вище обґрунтовує доцільність дослідження впливу комплексного ліпосомаль-

ного препарату, до складу якого входять бутафосфан, інтерферон, розторопша та вітаміни на формування імунітету та забезпечення високої природної резистентності у тварин, їхнього впливу на функцію печінки, позитивного впливу на обмін речовин в їхньому організмі, підвищення росту і збереженості поголів'я.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на молодих білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 180–200 г, яких утримували у стандартних умовах інститутського віварію Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Упродовж усього експерименту щурів утримували на збалансованому раціоні, який містив усі необхідні компоненти. Питну воду тварини отримували без обмежень зі скляних поїлок об'ємом 0,2 л.

Для досліджень було сформовано три групи щурів по 20 тварин у кожній. Щурам I і II дослідних груп для моделювання оксидативного стресу на 1-шу і 3-тю доби досліджень внутрішньом'язово вводили тетрахлорметан у формі 50 %-го олійного розчину у дозі 0,25 мл на 100 г маси тіла тварин. Тварин щоденно зважували, що дозволило чітко дотримуватися дії препарату у вказаній вище дозі протягом усього експерименту. Тварини контрольної групи отримували аналогічний об'єм фізіологічного розчину. Теоретично можливий вплив води на аналізовані гематологічні та біохімічні показники був однаковим у тварин як дослідної, так і контрольної групи. Тваринам II дослідної групи на 1-шу і 3-тю доби досліджень за годину після введення тетрахлорметану внутрішньом'язово вводили ліпосомальний препарат у дозі 2 мл на кг маси тварини. До складу цього препарату входять такі речовини: бутафосфан, інтерферон, розторопша плямиста та вітаміни А, Е і D₃. Кров для досліджень забирали з яремної вени на 2-гу, 5-ту, 10-ту та 15-ту доби експерименту під слабким ефірним наркозом.

Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей [14].

Одержані результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми *OriginPro 8* з використанням *t*-критерію Стьюдента. Вірогідними вважалися результати при $P < 0,05$.

У крові визначали фагоцитарну активність нейтрофілів за методом завершеного фагоцитозу з мікробною тест-культурою [17].

Результати й обговорення

Результати досліджень показників неспецифічної резистентності організму щурів за умов оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату наведені на рисунках 1–3. Встановлено, що після розвитку оксидативного стресу у щурів, викликаного введенням тетрахлорметану (I дослідна група), показники неспецифічної ланки імунного захисту відрізнялися від показників контрольної групи щурів: фагоцитарна активність нейтрофілів (ФА) знизилась до 37,2 % проти 48,9 % (рис. 1), фагоцитарний індекс (ФІ) становив 3,14 одиниць (од.) проти 5,8 од. (рис. 2), фагоцитарне число — 4,02 од. проти 5,1 од. у клінічно здорових тварин. Отримані результати вказують на вірогідне пригнічення неспецифічної ланки імунітету. На 5-у та 10-у доби досліджень за оксидативного стресу у щурів показники ФА, ФІ, ФЧ у крові залишалися низькими. І, як видно з рисунків 1–3, на 15-у добу наших досліджень ці показники були ще низькими: ФА становила 42,6 проти 48,9 %, що на 14 % нижче від контролю; ФІ — на 28 %, а ФЧ — на 12 % нижче від показників щурів контрольної групи.

За умов оксидативного стресу та після дії ліпосомального препарату у щурів II дослідної групи на 2-гу добу досліджень нами встановлено зростання показників ФА, ФІ, ФЧ у крові порівняно з показниками клінічно здорових щурів. Поступову нормалізацію показників неспецифічної ланки імунітету за умов оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату у сироватці крові щурів II групи відзначаємо на п'яту і десяту добу досліджень. Так, показник фагоцитарної активності нейтрофілів крові щурів II дослідної групи за умов оксидативного стресу, відповідно, становив 41,8 % і 45,6 %, у тварин контрольної

групи він дорівнював 48,9 %; показник фагоцитарного індексу — відповідно, 3,95 і 4,7 од. проти контролю 5,8 од., фагоцитарного числа — відповідно, 4,43, і 4,72 од. проти 5,1 од.

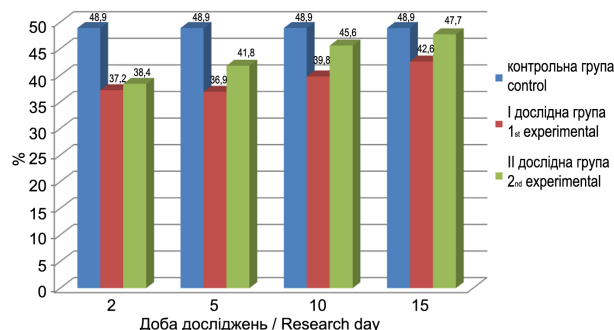


Рис. 1. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові щурів за умов оксидативного стресу та після дії ліпосомального препарату

Fig. 1. Phagocytic activity neutrophils in the blood of rats under oxidative stress and for action of liposomal preparation

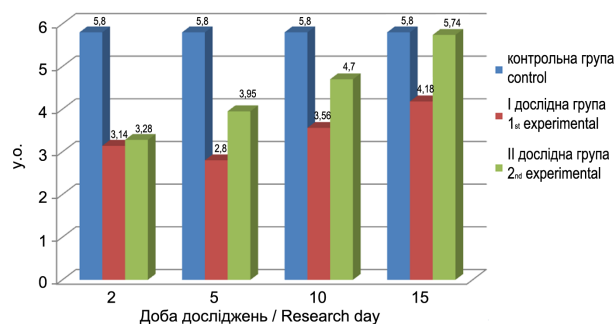


Рис. 2. Фагоцитарний індекс крові щурів за умов оксидативного стресу та після дії ліпосомального препарату

Fig. 2. Phagocytic index in the blood of rats under oxidative stress and action of liposomal preparation

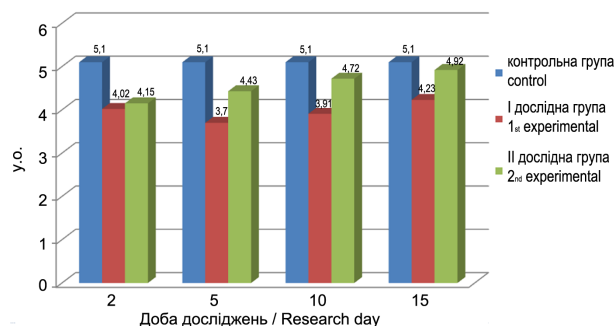


Рис. 3. Фагоцитарне число крові щурів за умов оксидативного стресу та після дії ліпосомального препарату

Fig. 3. Phagocytic number in the blood of rats under oxidative stress and for action of liposomal preparation

На 14-ту добу досліджень за умов оксидативного стресу та після дії ліпосомального препарату у щурів II дослідної групи нами встановлено нормалізацію показників неспецифічної ланки імунної системи. Зокрема, в межах фізіологічних величин у тварин II групи були показники фагоцитарної активності нейтрофілів (рис. 1), фагоцитарного індексу (рис. 2) та фагоцитарного числа (рис. 3).

Отже, проведенні дослідження показали, що введення щурам тетрахлорметану спричиняє антигенне навантаження на організм. При цьому в організмі уражених тварин відбувається напруження неспецифічної ланки імунітету організму — підвищуються фагоцитарна активність нейтрофілів, фагоцитарний індекс та фагоцитарне число крові. Особливо ці зміни були виражені у сироватці крові щурів на 2-у та 5-у доби експерименту. При цьому на основі наших досліджень встановлено позитивну дію ліпосомального препарату на організм щурів за експериментальної інтоксикації тетрахлорметаном. Це проявляється посиленням неспецифічної ланки імунної відповіді і зниженням антигенного навантаження.

Висновки

1. За умов отруєння щурів тетрахлорметаном упродовж досліджень неспецифічної ланки імунітету організму на 2-у добу досліджень відзначали зниження показників фагоцитарної активності нейтрофілів у крові уражених тварин упродовж всього періоду досліджень. На 14-у добу показник фагоцитарної активності нейтрофілів становив 42,6 % проти 48,9 % у контрольній групі тварин. Поряд із цим виявили зниження величин фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа крові щурів на 2-, 5-, 10-ту доби досліджень. На 14-у добу дослідження показники крові щурів, яким застосовували тетрахлорметан, були нижчими: відповідно, величина фагоцитарного індексу — на 38 %, а фагоцитарного числа — на 18 % від показників контрольної групи щурів.

2. Для підвищення неспецифічної ланки природної резистентності організму щурів за оксидативного стресу доцільно застосовувати ліпосомальний препарат, до складу якого

входять бутафосфан, інтерферон, плоди розтопші плямистої та вітаміни. Після застосування ліпосомального препарату щурам, за умов оксидативного стресу впродовж досліджень, у крові відновлюється рівновага неспецифічної ланки природної резистентності, а саме відсутні відхилення від норми показників фагоцитарної активності нейтрофілів, фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа крові. На 14-у добу дослідження показники неспецифічної ланки імунної системи у крові щурів дослідної групи коливалися у межах фізіологічних величин.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати досліджень будуть застосовані у подальшому вивченні впливу ліпосомального препарату на показники енергетичного обміну крові щурів за умов оксидативного стресу.

1. Batakov E. A. Effect of *Silbum marianum* oil and legalon on lipid peroxidation and liver antioxidant systems rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 2001, no. 64, pp. 53–55.

2. Bessonov A. S. Immunity and immunosuppression in parasitic diseases. *Tr. All-Russian inst. helminthology named after K. I. Scryabin*, 2004, no. 40, pp. 44–45. (in Russian)

3. Chumachenko V. Y., Chumachenko V. V., Pavlenko O. I. Study of the immune system. The mechanisms of body defense. *Veterinary Medicine of Ukraine*, 2004, no. 4, pp. 23–26. (in Ukrainian)

4. Chumachenko V. Y., Chumachenko V. V., Pavlenko O. I. Study of the immune system. Factors that have an influence on the resistance of animals. *Veterinary Medicine of Ukraine*, 2004, no. 5, pp. 33–37. (in Ukrainian)

5. Devanto V., Wu X., Liu R. H. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Agric. Food. Chem.*, 2002, vol. 50, no. 17, pp. 4959–4964.

6. Gutyy B., Lavryshyn Y., Binkevych V., Binkevych O., Paladischuk O., Stronsky J., Hariv I. Influence of “Metisevit” on the activity of enzyme and nonenzyme link of antioxidant protection under the bull’s body cadmium loading. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytsky*, 2016, vol. 18, no. 2 (66), pp. 52–58.

7. Khariv M. I. Dynamics of indices of aminotransferase activity in the blood serum of rats under conditions of oxidative stress and effect of liposomal medicinal product. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine*, 2016, vol. 7, no. 1, pp. 3–7. (in Ukrainian)

8. Khariv M., Gutyy B., Butsyak V., Khariv I. Hematological indices of rat organisms under conditions of oxidative stress and liposomal preparation action. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 276–289.

9. Khariv I. I. State of the immune system of turkeys affected with eimerioze-histomonozie invasion. *Scientific herald of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytsky*, 2011, vol. 13, no. 4 (50), Part 1, pp. 481–484. (in Ukrainian)
10. Kozhokov M. K., Alabov A. M. Immune biochemical parameters of blood at associative illnesses of poultry. *Tr. All-Russian Institute of helminthology named after K. I. Stryabin*, 2008, no. 37, pp. 191–194. (in Russian)
11. Martyshuk T. V. The influence of oxidative stress on the state of the antioxidant defense system in the organism of rats. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine*, 2016, vol. 7, no. 1, pp. 8–12. (in Ukrainian)
12. Martyshuk T. V., Gutyy B. V., Vishchur O. I. Level of lipid peroxidation products in the blood of rats under the influence of oxidative stress and under the action of liposomal preparation of “Butaselmavit”. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 2016, vol. 6, no. 2, pp. 22–27.
13. Meyers K. K., Watkins C. B., Pritts M. P., Liu R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Agric. Food. Chem.*, 2003, no. 23, pp. 6887–6892.
14. 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.
15. Rababah T. M., Ereifei K. I., Howard L. Effect of Ascorbic Acid and Dehydration on Concentrations of total Phenolics antioxidant Capacity, Anthocyanins and color in Fruits. *J. Agric. Food. Chem.*, 2005, no. 53 (11), pp. 443–447.
16. Sodomov N. A. Effect of vitamins A, E and C on the natural resistance of poultry. *Veterinary Medicine*, 2003, no. 2, pp. 47–48. (in Ukrainian)
17. Vlizlo V. V., Fedoruk R. S., Ratysh I. B. *Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary*. Reference book. 2012, 764 p. (in Ukrainian)
18. Wang W., Wideman R. F. Jr., Bersi T. K., Erf G. F. Pulmonary and hematological immune responses to intravenous cellulose micro-particles in broilers. *Poult. Sci.*, 2003, vol. 82, pp. 771–780.