

УДК 636.2:636.085.16

**ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА «БИО-20» НА ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТАРНОЙ И БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ КОРОВ И ТЕЛЯТ****Масалов В.Н., Ляхова О.Л., Сысоева Л.А.***ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел,  
e-mail: vladirmasalov121@yandex.ru*

Появление на рынке новых кормовых добавок диктует необходимость научного обоснования их применения в животноводстве. К числу важных эффектов, которыми должны обладать эти добавки, относится укрепление иммунной системы организма, особенно ее неспецифического звена. В настоящей работе проведено исследование влияния кормовой добавки «Био-20» на показатели функциональной активности нейтрофилов коров и телят, полученных от них. Для оценки фагоцитарной активности использовались фагоцитарный показатель, отражающий процент нейтрофилов, способных поглощать частицы латекса, фагоцитарный индекс – среднее число частиц латекса, поглощенных одним нейтрофилом. Кислород-зависимая бактерицидная активность оценивалась по результатам НСТ-теста в модификации Д.Н. Маянского. Определяли спонтанный (базальный) и индуцированный (стимулированный) уровень активности и вычисляемый по их соотношению индекс стимуляции. В качестве индуктора использовался зимозан. Кислород-независимую бактерицидную активность определяли на основании цитохимического выявления катионных лизосомальных белков (КЛБ), рассчитывая средний цитохимический коэффициент. Экспериментальным животным (взрослые коровы) проводили скормливание в течение 4 месяцев кормовой добавки в дозе 50 мл/голову/сутки: по схеме 10 суток – скормливание, 7 суток перерыв. Телятам экспериментальной группы выпаивание препарата проводили в дозе 20 мл/голову в течение 2 месяцев по схеме 10 суток – выпаивание, 7 суток – перерыв. Животные контрольной группы имели обычный рацион. Установлено достоверно подтвержденное повышение фагоцитарного показателя, резерва кислород-зависимой активности нейтрофилов у коров и телят экспериментальных групп. У телят отмечено также достоверное повышение фагоцитарного индекса.

**Ключевые слова:** пробиотик, коровы, телята, фагоцитарная способность, фагоцитарный индекс, катионные белки, оксидазная активность, фагоцитарный показатель, фагоцитарный индекс

**THE EFFECT OF THE BIO-20 PROBIOTIC, CAUSED IN RELATION TO NEUTROPHIL PHAGOCYtic AND MICROBICIDAL ACTIVITY INDICATORS OBSERVED IN COWS AND THEIR CALVES****Masalov V.N., Lyakhova O.L., Sysoeva L.A.***Orel State University named I.S. Turgenyev, Orel, e-mail: vladirmasalov121@yandex.ru*

Introduction of new feed additives in the market (namely, probiotics) dictates the necessity of formulating a scientific rationale for their use in the field of animal husbandry. Application of such additives is aimed at stimulation of various necessary effects, including strengthening of the immune system (especially in terms of its non-specific link). This paper reviews the effect of the «Bio-20» probiotic, caused in relation to neutrophil functional activity indicators observed in cows and their calves. The phagocytic coefficient describing a percentage of neutrophils, able to absorb latex particles, and phagocytic index, determining the average number of latex particles, absorbed by a single neutrophil, were applied to estimate actual phagocytic activity levels. Oxygen-dependent bactericidal activity rates were evaluated based on results of the nitro-blue tetrazolium reduction test, modified by D.N. Mayanskiy. We also tried to determine spontaneous (basal) and induced (stimulated) activity values and calculate the stimulation index, corresponding to their correlation. Zymosan was applied as a necessary inductor. The oxygen-independent bactericidal activity was defined based on the cytochemical identification of lysosome-cationic proteins (LCP) with subsequent calculation of the average cytochemical index. Experimental (laboratory) animals (cows) were fed with an additive in the ratio equal to 50ml/animal/day during four months on the basis of the following scheme: 10 days – feeding, 7 days – pause. We also carried out feeding of calves, included in the treatment group, with a preparation in the ratio equal to 20 ml/animal. Feeding was implemented over a period of two months, applying the following scheme: 10 days – feeding, 7 days – pause. All animals consumed standard rations. As a result, we determined a reliably verified increase in the phagocytic index, namely, a reserve of the oxygen-dependent neutrophil activity in cows and calves of stated experimental groups. The calves under examination additionally showed a significant increase in the phagocytic index.

**Keywords:** probiotic, cows, calves, phagocytic ability, phagocytic index, cationic proteins, oxidase activity, phagocytic coefficient, phagocytic index

Устойчивое развитие молочного животноводства является одним из важных направлений в решении проблемы продовольственной безопасности Российской Федерации. Эффективность данной отрасли зависит от комплекса взаимосвязанных факторов, среди которых ведущим является освоение инноваций. В свою очередь это предполагает про-

должение научных исследований по определению фундаментальных особенностей жизнеобеспечения организма высокопродуктивных коров в зависимости от условий питания, содержания и изменения физиологического состояния с последующим использованием их результатов непосредственно в практическом животноводстве [1].

В настоящее время в рамках концепции адекватного или «идеального» рациона для продуктивных животных проводятся многочисленные исследования по подбору и оценке различных кормовых компонентов, способных обеспечить оптимальное протекание физиологических процессов, рост, продуктивность и здоровье животного. К числу таких компонентов относятся пробиотики, которые рассматриваются ведущими специалистами как кормовые добавки и препараты, способные решить широкий круг проблем, связанных с коррекцией кишечного биоценоза, иммунной, гормональной и ферментной систем молодняка и взрослых животных. Кроме того, применение пробиотиков позволяет повысить продуктивность животноводства и обеспечить производство высококачественной, безопасной в бактериальном и химическом отношении экологически чистой продукции [2–4].

Появление новых видов пробиотиков и кормовых добавок определяет необходимость научного обоснования их практического применения в животноводстве. При этом, учитывая особенности современных технологий промышленного животноводства (высокая концентрация поголовья безвыпасное и безвыгульное содержание, частые перегруппировки, изменение микроклимата, не всегда сбалансированное и полноценное кормление) и связанный с этим высокий риск инфекционных заболеваний, особую актуальность приобретает оценка влияния пробиотиков на состояние иммунной системы животных.

Центральным звеном в формировании противоинфекционного неспецифического иммунитета организма являются фагоцитирующие лейкоциты, в первую очередь нейтрофилы [5–7].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния кормовой добавки «Био-20» на показатели функциональной активности нейтрофилов коров и телят, полученных от этих коров.

### Материалы и методы исследования

Исследования проводились в условиях опытного хозяйства ООО «Орловская Нива». Использовались коровы черно-пестрой породы 4-летнего возраста и телята, полученные от них. Методом парных аналогов были сформированы по 2 группы животных – экспериментальная и контрольная по 10 голов в каждой. Животные контрольной группы находились на основном рационе, соответствующем данной возрастной группе. Экспериментальным животным (взрослые коровы) проводили скармливание препарата в течение 4 месяцев в дозе 50 мл/голову/сутки: по схеме 10 суток – скармливание, 7 суток перерыв. Из телят, в возрасте 1–1,5 месяцев, полученных от коров экспериментальной группы, была сформиро-

ваны экспериментальная группа, в которой препарат применяли в дозе 20 мл/голову в течение 2 месяцев по схеме 10 суток – выпаивание, 7 суток – перерыв. Телята, полученные от контрольных коров, составили контрольную группу. Животные содержались в условиях, соответствующих ветеринарно-зооигиеническим требованиям. Экспериментальное исследование выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г.). Пробы крови отбирали утром до кормления из яремной вены у 7 голов из каждой группы. Оценка показателей неспецифического иммунитета проводилась до начала эксперимента, на следующий день и через месяц после окончания применения препарата.

Для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови использовались следующие показатели: фагоцитарный показатель – процент нейтрофилов, способных поглощать частицы латекса (ФП%), фагоцитарный индекс – среднее число частиц латекса, поглощенных одним нейтрофилом (ФИ у.е.).

Определение кислород-зависимой бактерицидной активности проводилось в тесте восстановления нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан (НСТ-тест)) в модификации Д.Н. Маянского [8]. Оценивался базальный и стимулированный уровень активности в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте (с-НСТ-тест и-НСТ-тест). В качестве индуктора использовался зимозан, с помощью которого моделировались условия бактериального заражения, что позволяет определить функциональный резерв поглощательной и микробицидной способности нейтрофилов. Результат выражали в процентах НСТ-положительных нейтрофилов на 100 нейтрофилов и в единицах индекса стимуляции (ИС), который рассчитывали отношением значений и-НСТ теста к с-НСТ-тесту.

Кислород-независимую бактерицидную активность определяли на основании цитохимического выявления катионных лизосомальных белков (КЛБ) по В.И. Жибинова [9], рассчитывая средний цитохимический коэффициент (СЦК) катионного белка по формуле  $СЦК = (0a + 1b + 2v + 3г + 4д) / 100$ , где цифры обозначают интенсивность окраски, буквы – количество (в %) клеток с соответствующей положительной цитохимической реакцией. При этом 0-я степень означает отсутствие окраски цитоплазмы; 1-ая степень – наличие в цитоплазме единичных гранул красителя или слабое диффузное её окрашивание; 2-ая степень – умеренное количество гранул красителя или умеренное диффузное окрашивание, остаются неокрашенные участки цитоплазмы; 3-я степень – большое количество гранул красителя в цитоплазме, высокая интенсивность окраски; 4-ая степень – гранулами красителя заполнена вся цитоплазма, неокрашенных участков нет, интенсивность окраски наибольшая, часто покрывается ядро.

Полученный цифровой материал обрабатывался статистически с определением достоверности наблюдаемых изменений с помощью критерия Стьюдента при  $P < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты оценки функционального состояния нейтрофилов коров в динамике проведенного исследования представлены в табл. 1.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, до начала скармливания пробиотика фагоцитарный показатель у коров в контрольной и экспериментальной группе достоверно не отличался и находился в пределах физиологических значений. Через 4 месяца в экспериментальной группе отмечалось заметное, на 26,7%, увеличение числа нейтрофилов, способных проявлять фагоцитарную активность, тогда как в контрольной группе заметных изменений показателя фагоцитарной активности нейтрофилов не регистрировалось. Результаты оценки фагоцитарного показателя, полученные через месяц после окончания скармливания пробиотика «Био-20», позволяют говорить о сохранении положительного эффекта пробиотика у коров экспериментальной группы.

Фагоцитарный индекс как у экспериментальных, так и контрольных животных на протяжении эксперимента не изменялся и находился в пределах нормативных значений.

Результаты оценки кислород-зависимой бактерицидной активности нейтрофилов с помощью НСТ-теста показали, что в отсутствие стимуляции число НСТ-позитивных нейтрофилов не превысило  $17,8 \pm 0,5\%$  и не обнаруживало различий между контрольной и экспериментальной группой во все сроки наблюдений. Внесение в пробы крови коров контрольной и экспериментальной группы зимозана обусловило достоверно значимое по сравнению с базальным уровнем повышение числа оксидазно активных нейтрофилов, что указывает на наличие высокого адаптационного резерва этого защитного механизма. При этом до начала эксперимента достоверных различий между экспериментальной и контрольной группой не определялось. В контрольной группе на протяжении всех сроков наблюдения количество НСТ-позитивных нейтрофилов достоверно не изменялось и колебалось в пределах от 46,4% до 51,2%. В экспериментальной группе в условиях стимуляции зимозаном через 4 месяца скармливания пробиотиком наблюдалось достоверное на 11,2% увеличение числа НСТ-положительных нейтрофилов. Через месяц после прекращения скармливания пробиотика это увеличение сохранилось и составило 12,6%. Одновременно в экспериментальной группе регистрировалось достоверное увеличение индекса стимуляции нейтрофилов (табл. 1).

Кислород-независимая микробицидность нейтрофилов периферической крови определялась по уровню содержащихся

в них катионных белков, которые занимают одно из ведущих мест в реализации и координации неспецифических защитных реакций организма. Недостаток катионных белков в нейтрофилах приводит к резкому снижению неспецифической резистентности организма [5, 6]. Результаты оценки содержания катионных белков представлены в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Как видно, значения цитохимического коэффициента во все наблюдаемые сроки в контрольной и экспериментальной группах достоверно не изменялись и находятся в пределах физиологической нормы (табл. 1). Отсутствие межгрупповых различий и достоверных изменений со стороны катионных белков во все сроки наблюдений, очевидно, обусловлены тем, что их содержание не зависит от стимуляции нейтрофилов и определяется количеством биологически активных веществ, синтезированных в период гранулоцитопоза в красном костном мозге [10].

Результаты оценки показателей функционального состояния нейтрофилов у телят в динамике сроков исследования представлены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, перед началом выпаивания процентное содержание нейтрофилов, способных поглощать латекс, в контрольной и экспериментальной группах телят достоверно не отличалось и находилось в диапазоне нормативных значений. Через 2 месяца выпаивания и через месяц после прекращения выпаивания в экспериментальной группе отмечается достоверное, на 33,5%, увеличение числа фагоцитирующих нейтрофилов. В контрольной группе в указанные сроки достоверного изменения фагоцитарного показателя не зарегистрировано.

Поглотительная способность нейтрофилов, как показывают значения фагоцитарного индекса (ФИ), перед началом эксперимента не имела существенных межгрупповых различий и в контрольной группе во все сроки наблюдения сохранялась на уровне первоначальных значений. В экспериментальной группе через 2 месяца выпаивания пробиотика отмечается достоверное на 47,5% увеличение среднего числа поглощаемых нейтрофилом частиц латекса. Через месяц после прекращения приема пробиотика эффект стимуляции поглотительной способности нейтрофилов у телят экспериментальной группы сохранялся.

Результаты оценки кислород-зависимой активности нейтрофилов в препаратах нативной крови не выявили заметных

межгрупповых различий в содержании НСТ-положительных клеток. В условиях стимуляции зимозаном перед началом эксперимента также не определялось межгрупповых отличий в содержании НСТ-положительных клеток (+НСТ индуцированный). При этом в экспериментальной группе через 2 месяца выпаивания препаратом «Био-20» отмечено достоверное (на 14,2%) увеличение НСТ-положительных клеток (+НСТ индуцированный) по сравнению с первоначальными значениями с сохранением указанного различия через месяц после окончания приема препарата. Одновременно выявлено достоверное уве-

личение индекса стимуляции (ИС) нейтрофилов. В контрольной группе содержание НСТ-положительных клеток (+НСТ индуцированный) не изменялось на протяжении всех сроков наблюдений. Не обнаружено также достоверных изменений индекса стимуляции нейтрофилов.

Оценка кислород-независимой бактерицидности нейтрофилов показала, что во все сроки наблюдения значения среднего цитохимического коэффициента у животных экспериментальной и контрольной групп достоверно не изменялись и находились в пределах нормативных значений.

**Таблица 1**

Показатели функционального состояния нейтрофилов коров (M ± m)

Показатели	группы (n = 7)	Перед началом скармливания	Через 4 месяца	Через месяц после окончания скармливания
ФП, %	контрольная	48,7 ± 2,3	49,5 ± 2,2	47,7 ± 1,8
	экспериментальная	49,4 ± 1,5	62,6 ± 5,8*	64,3 ± 3,1*
ФИ у. е.	контрольная	5,3 ± 0,5	5,8 ± 0,5	5,3 ± 0,4
	экспериментальная	5,4 ± 0,7	5,5 ± 0,3	5,9 ± 0,1
+НСТ спонтанный %	контрольная	17,6 ± 1,8	17,3 ± 1,5	17,5 ± 2,7
	экспериментальная	17,8 ± 1,5	17,20 ± 2,4	17,3 ± 2,5
+НСТ индуцированный %	контрольная	46,4 ± 3,1	48,4 ± 1,7	51,2 ± 2,3
	экспериментальная	48,2 ± 3,8	59,4 ± 2,6*	60,8 ± 2,3*
ИС (у.е.)	контрольная	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,3
	экспериментальная	2,5 ± 0,2	3,3 ± 0,2*	3,5 ± 0,2*
СЦК (у.е.)	контрольная	1,77 ± 0,06	1,72 ± 0,08	1,72 ± 0,06
	экспериментальная	1,73 ± 0,05	1,78 ± 0,08	1,77 ± 0,06

Примечание. \* достоверные изменения по сравнению с началом скармливания, P < 0,05.

**Таблица 2**

Показатели фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов у телят (M ± m)

Показатели	Группы (n = 7)	Перед началом выпаивания	Через 2 месяца после выпаивания	Через месяц после окончания выпаивания
ФП, %	контрольная	38,7 ± 2,4	40,5 ± 2,1	37,7 ± 1,8
	экспериментальная	39,4 ± 2,5	52,6 ± 2,6*	54,3 ± 4,1*
ФИ у. е.	контрольная	6,3 ± 0,7	6,8 ± 0,5	6,3 ± 0,4
	экспериментальная	5,9 ± 0,4	8,7 ± 0,3*	7,9 ± 0,1*
+НСТ спонтанный, %	контрольная	11,6 ± 0,8	14,3 ± 1,5	15,5 ± 1,7
	экспериментальная	12,8 ± 1,5	13,3 ± 2,4	16,3 ± 2,2
+НСТ индуцированный, %	контрольная	36,4 ± 2,7	38,4 ± 2,4	37,2 ± 2,3
	экспериментальная	38,2 ± 3,3	52,4 ± 2,8*	50,4 ± 3,1*
ИС (у.е.)	контрольная	3,1 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,3
	экспериментальная	3,1 ± 0,2	4,3 ± 0,4*	3,8 ± 0,3*
СЦК (у.е.)	контрольная	1,42 ± 0,04	1,46 ± 0,02	1,47 ± 0,05
	экспериментальная	1,47 ± 0,03	1,49 ± 0,02	1,51 ± 0,06

Примечание. \* достоверные изменения по сравнению с началом выпаивания, P ≤ 0,05.

### Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что применение пробиотика «Био-20» способствует повышению фагоцитарной способности нейтрофилов крови как у взрослых коров, так и у телят, полученных от этих коров, о чем свидетельствует достоверное увеличение фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса у экспериментальных животных и отсутствие достоверных изменений у животных контрольной группы.

Применение кормовой добавки «Био-20» оказывает достоверно подтвержденный эффект на показатели кислород-зависимой бактерицидности, способствуя увеличению резерва оксидантно активных нейтрофилов крови коров и телят, полученных от этих коров и практически не влияет на содержание катионных белков.

В целом полученные результаты позволяют рекомендовать использование кормовой добавки «Био-20» в качестве средства, укрепляющего неспецифический иммунитет как взрослых коров, так и телят.

### Список литературы

1. Сысоев В.А., Василенко Т.Ф., Русаков Р.В. Проблемы развития молочного животноводства в России и современные подходы к их решению // Достижения науки и техники АПК. 2017. Т. 31. № 3.; URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/problemy-razvitiya-molochnogo-zhivotnovodstva-v-rossii-i-sovremennye-podhody-k-ih-resheniyu> (дата обращения: 25.10.2018).
2. Соколенко Г.Г., Лазарев Б.П., Миньченко С.В. Пробиотики в рациональном кормлении животных // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК-продукты здорового питания. 2015. № 1 (5). С. 72–78.
3. Смирнова Л.В., Субботин С.В., Хоштария Е.Е. Применение дрожжевого пробиотика в рационах молочных коров // Молочнохозяйственный вестник. 2014. № 2 (14). С. 37–42.
4. Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Правдин В.Г., Кравцова Л.З., Бобровская О.И., Павлов Д.С. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // Фундаментальные исследования. 2012. № 1. С. 184–192.
5. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М.: Медицина, 1978. 128 с.
6. Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Современное представление о роли клеток врожденного иммунитета при инфекционных болезнях // Бюллетень СО РАМН. 2011. № 4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennoe-predstavlenie-o-rol-i-kletok-vrozhdennogo-immuniteta-pri-infektsionnyh-boleznyah> (дата обращения: 27.11.2018).
7. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Исследование температурозависимых молекулярных механизмов развития инфекций – ключ к созданию современных профилактических средств (обзор) // Современные технологии в медицине. 2016. № 3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-temperaturozavisimyh-molekulyarnyh-mehanizmov-razvitiya-infektsiy-klyuch-k-sozdaniyu-sovremennyh-profilakticheskikh> (дата обращения: 27.11.2018).
8. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д., Макарова О.П. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов: методические рекомендации. Новосибирск, 1996. 73 с.
9. Жибинов В.И. Применение лизосомально-катионного теста // Ветеринария. 1983. № 8. С. 30–31.
10. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М: Изд-во РАМН, 2009. 208 с.