

УДК 612.112.9+612.176:636.5

Індекс стимуляції нейтрофілів у людей, котрі споживають м'ясо курчат-бройлерів за умов корекції передзабійного стресу

С.С. Грабовський¹, О.С. Грабовська²

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, Україна

²Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна

Наведено дані про зміни індексу стимуляції нейтрофілів (ІСН) крові чоловіків після споживання м'яса курчат-бройлерів, яким перед забоєм до корму аерозольним методом вносили імуномодулятори природного походження. Антистресорами та імуномодуляторами у передзабійний період курчат-бройлерів слугували біологічно активні речовини з екстракту селезінки. Птиці дослідної групи (І група) за п'ять днів до забою вводили аерозольним методом екстракт селезінки (70% спиртовий розчин біологічно активних речовин, об'ємом 1,4 мл на курча). Птиці контрольної групи (ІІ) за п'ять днів до забою таким же чином давали до корму 70% розчин етанолу в аналогічному об'ємі. У цільній крові чоловіків визначали ІСН. У крові курчат-бройлерів досліджували вміст поліамінів путресцину, сперміну та спермідину. Вірогідно більший вміст поліамінів спостерігали у курчат-бройлерів першої дослідної групи, яким додатково до основного раціону вводили екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку. Отримані результати можуть бути використані у дослідженнях показників імунітету сільськогосподарських тварин із метою підвищення резистентності організму, корекції та нівелювання стресового стану тварин перед забоєм і поліпшення якості продукції.

Ключові слова: природна резистентність; екстракт селезінки; курчата-бройлери; поліаміни; передзабійний стрес

Neutrophils stimulation index in people under consumption of broiler chickens meat at pre-slaughter stress correction

S. Grabovsky¹, O. Grabovska²

¹Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj, Lviv, Ukraine

²Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, Ukraine

The data about changes in neutrophils stimulation index in men blood after consumption of broiler chicken meat with the natural origin immunomodulators, introduced in feed before slaughter, is presented in this paper. Spleen extract biologically active substances were used as immunomodulators and anti-stressors during pre-slaughter period. Biologically active substances influence on putrescin, spermine and spermidine content in broiler chicken blood before slaughter and on some non-specific resistance indices in people was determined after consumption of broiler chicken meat. Two groups of broiler chickens at one month age were formed for the study. The spleen extract obtained with ultrasound application (I research group) served as biologically active substances was added to the feed of broiler chickens in pre-slaughter period (five days before slaughter). Blood polyamines such as putrescin, spermine and spermidine were determined by the method of High-performance liquid chromatography (HPLC) on the liquid chromatograph Agilent 1200 (USA). The second experiment was conducted on 10 people. We recruited 10 healthy male medical students (20 years old, on average) after the National Medical license examina-

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

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj, Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine
Tel.: +38-096-950-00-01. E-mail: grbss@ukr.net

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна
Institute of Animal Biology of NAAS, V. Stus Str., 38, Lviv, 79034, Ukraine
Tel.: +38-096-279-26-33. E-mail: alice_grb@ukr.net

tion. Spleen extract polyamines as immunomodulators and anti-stressors have the most effective influence on total quantity of polyamines in broiler chicken blood. As a result of research, it is found that aerosol introduction of spleen extract into broiler chicken feed reliably increases total quantity of polyamines by 39% and, in particular, spermidine concentration by 34%, and spermine by 40% compared with broiler chickens of the control group. Some non-specific body resistance indices in men blood upon consumption of broiler chicken meat varied within the physiological norm. The neutrophils stimulation index increased in men blood (+0,82) after consumption of meat of broiler chickens to which spleen extract as immunomodulator and anti-stressor was introduced before slaughter (experimental group). The neutrophils stimulation index decreased in men blood (-2,21) after consumption of broiler chickens meat at pre-slaughter stress (control group). The neutrophils stimulation index in men blood of experimental and control groups differed by 34,8%, but did not go beyond the physiological norm. At the final stage of poultry feeding it is necessary to consider pre-slaughter stress and to apply biologically active substances of natural origin, such as spleen extract. The results obtained in the experiment on broiler chickens can be used in studies of non-specific resistance indices of the farm animals for increasing the organism resistance, correction and avoiding of pre-slaughter stress and improvement of product quality.

Keywords: natural resistance; spleen extract; broiler chickens; polyamines; pre-slaughter stress

Вступ

Екологічний стан навколишнього середовища, спосіб життя та харчування, сфера діяльності, надмірні фізичні навантаження – далеко не всі чинники, впливу яких знає імунна система організму людини протягом свого життя. Стреси різного характеру, пригнічений стан організму, застосування деяких лікарських засобів руйнують імунну систему. У контролі вродженої імунної відповіді у вищих хребетних важливу роль відіграють поліаміни: спермідин, спермін та путресцин. Поліаміни можуть сприяти розвитку відповідної адаптивної імунної реакції (Reyes-Becerril et al., 2010; Minois et al., 2011; Maslyanko et al., 2013), регулювати апоптоз В-клітин під час делеції клону (Nitta et al., 2001), поглинатися Т- та В-лімфоцитами, а В-лімфоцити можуть ініціювати транспорт позаклітинних поліамінів (De Benedette et al., 1993).

У літературі недостатньо висвітлені питання щодо впливу передзабійного стану тварин на окремі показники імунітету. Слід зауважити, що перед забоєм тварин не можна використовувати препарати, які б мали негативний вплив на організм людини, котра споживає м'ясу продукцію. Продукція тваринництва, отримана від сільськогосподарських тварин за стресового стану, в якому організм перебуває перед забоєм, може бути непридатною для споживання. Фагоцитоз – головний механізм природної резистентності, а також обов'язкова ланка індукції та формування специфічної імунної відповіді. Фагоцитарну роль виконують поліморфно-ядерні лейкоцити. Нейтрофільні гранулоцити найчастіше фагоцитують збудників гострих інфекцій. У гранулах фагоцитів міститься набір неензимних катіонних білків, лізоцим, мієлопероксидаза, за рахунок яких відбувається пригнічення активності фагоцитованих бактерій та їх перетравлення (Frimel, 1987).

Англійські вчені-онкоепідеміологи (Doll and Peto, 1984) підрахували питому частку різноманітних чинників, що впливають на виникнення раку. Центральна роль у процесі канцерогенезу належить харчуванню: цей чинник складає 35% серед можливих причин онкології. Друге місце посідає паління, на яке припадає 30% випадків. На інші причини онкологічних новоутворень доводиться значно менший відсоток. Далеко не секрет, що існує зв'язок між складом і характером харчування людини та вірогідністю розвитку злоякісних пухлин. Близько 40% випадків онкологічних захворювань у чоловіків і 60% у жінок, за даними ВООЗ,

зумовлені незбалансованим харчуванням (Bespalov, 2008). При цьому, крім незбалансованого харчування, в основному звертається увага на хімічні речовини, фізичні чинники, віруси та мікроорганізми, нераціональне зберігання, переробку та пакування їжі, кулінарну обробку та приготування, але не враховується стресовий стан тварин перед забоєм. Нині ще недостатньо уваги приділено впливу таких продуктів харчування на імунітет людини.

У попередніх дослідженнях (модельний дослід) встановлено вплив передзабійного стану на клітинний імунітет та рівень кортизолу у плазмі крові шурів і курчат-бройлерів. Внесення у корм екстракту селезінки супроводжувалось зниженням рівня кортизолу у плазмі крові як шурів, так курчат-бройлерів, що може свідчити про зменшення стресу перед забоєм (Grabovskiy, 2014a, 2014b). У крові шурів, які протягом п'яти діб перед забоєм додатково з кормом отримували екстракт селезінки, вірогідно підвищився фагоцитарний індекс і зменшилась концентрація кортизолу (Grabovskiy, 2013a). Для стимулювання імунітету та зменшення стресового стану перед забоєм курчат-бройлерів ми використали екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку (Grabovskiy, 2013b).

Мета даної статті – оцінити вплив біологічно активних речовин екстракту селезінки на концентрацію путресцину, сперміну, спермідину в крові курчат-бройлерів в умовах передзабійного стресу та на показники неспецифічного імунітету у людей, котрі споживають м'ясо цих курчат.

Матеріал і методи досліджень

Для проведення першого дослідження сформовано дві групи курчат-бройлерів одномісячного віку (по 5 курчат у кожній). Як біологічно активні речовини у передзабійний період (за п'ять діб до забою) у корм курчат-бройлерів аерозольним методом вводили екстракт селезінки (70% спиртовий розчин екстракту селезінки, об'ємом 1,4 мл на одне курча дослідної групи). Курчатам контрольної групи аналогічно додавали до корму 70% розчин етанолу в еквівалентному об'ємі. Дослід тривав п'ять діб. Забій птиці проводили у ранкові години. В експерименті дотримано усі біоетичні норми Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.), «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим

Національним конгресом із біоетики (Київ, 2001), та принципи гуманності, викладені у директиві Європейської Спільноти (Directive, 2010).

Для проведення другого дослідження підібрано 10 чоловіків віком 20–21 рік та масою тіла 60–65 кг, яких поділили на дві групи (по п'ять у кожній). Чоловіки споживали м'ясо курчат-бройлерів масою тіла від 1,8 до 2,0 кг на початку та у кінці дослідження, який тривав три дні. М'ясо було тушковане лише на соняшниковій олії. Половину м'яса курчати чоловіки споживали після першого відбору крові, решту – протягом двох діб. На наступний день зранку (о 9 годині) знову брали кров для аналізу.

Вміст поліамінів у крові визначали методом рідинної хроматографії високого тиску (РХВТ) (Gerbaut, 1991) на рідинному хроматографі Agilent 1200 (США). Фагоцитарну активність нейтрофілів периферійної крові визначали методом Grimel (1987). Принцип методу заснований на кількісному визначенні захоплених нейтрофілами гранул латексу. НСТ-тест виконували відповідно до методик Grimel (1987), Lapovets and Lutsyk (2002). Метод базується на піноцитозі фагоцитами світло-жовтого розчину нітросинього тетразоліну (НСТ), який відновлюється у цитоплазмі клітин до нерозчинного диформазану (у вигляді темно-синіх гранул). Принцип методу: за умов стимульованого НСТ-тесту вивчено не тільки спонтанну здатність гранулоцитів відновлювати нітросиній тетразолій, а також проводити штучну стимуляцію клітин бактеріальними ендотоксинами, зимозаном. Такий тест свідчить про резервну бактерицидну здатність клітин.

Вірогідність різниці між вибірковими середніми оцінювали за t-критерієм Стьюдента, попередньо оцінюючи її відповідність нормальному розподілу.

Результати та їх обговорення

Аналізуючи отримані дані щодо вмісту поліамінів перед забоем у крові курчат-бройлерів дослідної групи, яким до корму додавали екстракт селезінки, оброблений ультразвуком, установили, що загальна кількість поліамінів збільшилась порівняно з контролем на 39% ($P < 0,01$) і, зокрема, концентрація спермідину — на 34% ($P < 0,05$), а сперміну — на 40% ($P < 0,01$). Концентрації путресцину були найменшими у крові курчат-бройлерів як дослідної, так і контрольної груп відносно інших поліамінів (рис. 1).

Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів (Brodal et al., 1999; Soda et al., 2009; Hashemi et al., 2014; Pohlenz et al., 2014), оскільки додаткове застосування поліамінів може впливати на їх концентрацію у тканинах та крові зокрема. На основі досліджень свавців та птиці і, зокрема, курчат-бройлерів можна зробити висновок, що використання імуномодуляторів, які містять поліаміни, знижує негативний вплив передзабійного стресу та підвищує імунітет тварин.

Показники природної резистентності у крові людей, котрі споживали курчатину, зазнавали змін у межах фізіологічної норми. У крові чоловіків після споживання м'яса курчат-бройлерів, які перед забоем як антистресор та імуномодулятор отримували екстракт селезінки

(дослідна група), зріс ІСН (+0,82). У чоловіків, які споживали м'ясо курчат-бройлерів, котрим не давали екстракт селезінки (контрольна група) в умовах передзабійного стресу, ІСН знизився (–2,21) порівняно з початком дослідження. Вірогідної різниці в інших показниках природної резистентності ми не спостерігали (рис. 2).

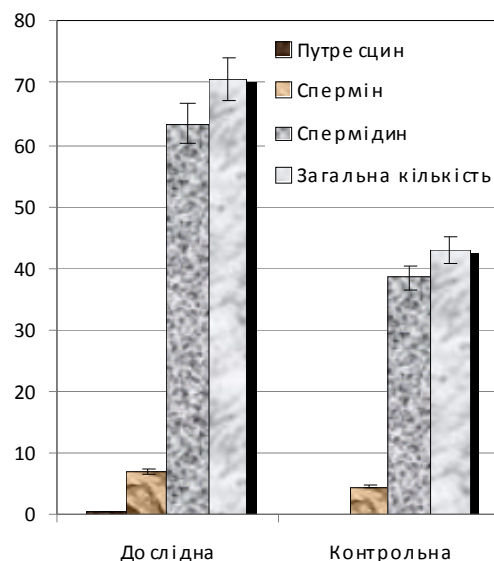


Рис. 1. Концентрація поліамінів у крові курчат-бройлерів (нмоль/мл)

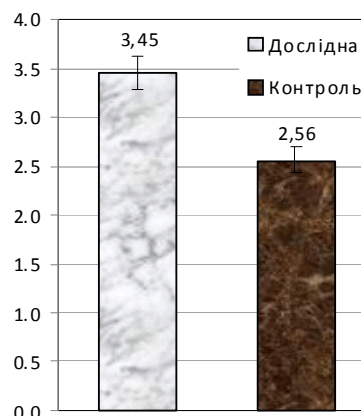


Рис. 2. Індекс стимуляції (нейтрофіли), абс. число (г/л)

Як видно на рисунку індекси стимуляції НТС у крові чоловіків дослідної та контрольної груп різнилися на 0,89 г/л (34,8%), хоча не виходили за межі фізіологічної норми. Імовірно поліаміни можуть впливати на показники імунітету людей, що узгоджується з дослідженнями інших авторів (Catros-Quemener et al., 1999; Kalac and Krausová, 2005; Kalač, 2014; Vargas et al., 2014; Galitsopoulou et al., 2015). Вірогідної різниці у показниках природної резистентності – концентрації лейкоцитів, нейтрофілів (паличкоядерних, сегментноядерних), фагоцитарного показника (нейтрофіли) (латекс-тест, 30 хв), НТС спонтанного та стимульованого ми не спостерігали. Перспективними є дослідження резистентності організму та, зокрема фагоцитарного індексу у сільськогосподарських тварин за умов передзабійного стресу на тлі використання імуностимуляторів природного походження.

Висновки

Додаткове уведення до корму імуностимуляторів (поліамінів), отриманих з екстракту селезінки, супроводжувалось підвищенням їх загальної кількості та вмісту путресцину, сперміну та спермідину у крові курчат-бройлерів за умов корекції передзабійного стресу, що, імовірно, сприяє поліпшенню якісних характеристик їх м'яса. Споживання м'яса цих курчат-бройлерів призводило до вірогідного підвищення індексу стимуляції нейтрофілів у крові чоловіків та резистентності їх організму.

Бібліографічні посилання

- Bespalov, V.G., 2008. Pitanie i rak. Dieticheskaia profilaktika onkologicheskikh zabojevanij [Nutrition and cancer. Dietary prevention of cancer]. JuSMA, Moscow (in Russian).
- Brodal, B.P., Eliassen, K.A., Ronning, H., Osmundsen, H., 1999. Effects of dietary polyamines and clofibrate on metabolism of polyamines in the rat. *J. Nutr. Biochem.* 10, 700–708.
- Catros-Quemener, V., Chamaillard, L., Bouet, F.M., 1999. Les polyamines: Role diagnostique et cible therapeutique en cancerologie. *S-Medecine / Sciences* 15, 1078–1085 (in French).
- De Benedette, M., De Olson, J.W., Snow, E.C., 1993. Expression of polyamine transporter activity during B-lymphocyte cell cycle progression. *The Journal of Immunology* 150(10), 4218–4224.
- Doll, R., Peto, R., 1984. Prichiny raka: Kolichestvennaja ocenka ustranimykh faktorov riska onkologicheskikh zabojevanij v SShA [Causes of cancer: Quantitative estimation of avoidable risks of cancer in the USA]. *Naukova Dumka, Kiev* (in Russian).
- Frimel, G., 1987. Immunologicheskie metody [Immunological methods]. *Medicine, Moscow* (in Russian).
- Galitsopoulou, A., Michaelidou, A.M., Menexes, G., Alichanidis, E., 2015. Polyamine profile in ovine and caprine colostrum and milk. *Food Chem.* 173, 80–85.
- Gerbaut, L., 1991. Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.* 37(12), 2117–2120.
- Grabovskiy, S.S., 2013. Jekstragirovanie biologicheskii aktivnykh veshhestv selezenki s ispolzovaniem ultrazvuka [Extracting of biologically active substances of spleen with the application an ultrasound]. *Sbornik Nauchnyh Trudov SWorld.* 49, 3–6 (in Russian).
- Grabovskiy, S.S., 2013. Vliyanie biologicheskii aktivnykh veshhestv raznogo proishozhdenija na laboratornykh zhivotnykh v stressovom sostojanii [Different origin biologically active substances influence on laboratory animals at stress state]. *Sbornik Nauchnyh Trudov SWorld* 44, 13–15 (in Russian).
- Grabovskiy, S.S., 2014. Vplyv imunomodulyatoriv pryrodnoho pokhodzhennya na pokaznyky klitynnoho imunitetu i riven kortyzolu v krovi shchuriv za umov stresu [Effect of natural immunomodulators influence on cellular immunity indices and cortisol level in rat's blood at pre-slaughter stress]. *Biologichni Studiyi – Studia Biologica* 8(1), 93–102 (in Ukrainian).
- Grabovskiy, S.S., 2014. Vplyv imunomodulyatoriv pryrodnoho pokhodzhennya na vmist insulinu u krovi kurchat-broyleriv za umov stresu [Natural immunomodulators influence on insulin content in broiler chickens blood at pre-slaughter stress]. *ScienceRise* 1(1), 67–69 (in Ukrainian).
- Hashemi, S.M., Loh, T.C., Foo, H.L., Zulkifli, I., Hair-Bejo, M., 2014. Dietary putrescine effects on performance parameters, nutrient digestibility, intestinal morphology and tissue polyamine content of broilers fed low protein diet. *Iran. J. Vet. Res.* 15(4), 385–391.
- Kalač, P., 2014. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005 – mid 2013. *Food Chemistry* 161, 27–39.
- Kalac, P., Krausová, P., 2005. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry* 90, 219–230.
- Lapovets, L.Y., Lutsyk, B.D., 2002. Posibnyk z laboratornoyi imunolohiyi [Handbook of laboratory immunology]. *Lviv* (in Ukrainian).
- Maslyanko, R.P., Grabovskiy, S.S., Grabovska, O.S., 2013. Suchasni uyavleniya pro fahotsytoz [Modern notion of phagocytosis]. *Biolohiya Tvaryn* 15(3), 63–69 (in Ukrainian).
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., 2011. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)* 3(8), 716–732.
- Nitta, T., Igarashi, K., Yamashita, A., Yamamoto, M., Yamamoto, N., 2001. Involvement of polyamines in B cell receptor-mediated apoptosis: Spermine functions as a negative modulator. *Exp. Cell Res.* 265(1), 174–183.
- Pohlenz, C., Buentello, A.J., Helland, S., Gatlin, D.M., 2014. Effects of dietary arginine supplementation on growth, protein optimization and innate immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque 1818). *Aquacult. Res.* 45(3), 491–500.
- Reyes-Becerril, M., Ascencio-Valle, F., Tovar-Ramírez, D., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2011. Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 248–254.
- Soda, K., Kano, Y., Sakuragi, M., Takao, K., Lefor, A., Konishi, F., 2009. Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 55, 361–366.
- Vargas, A.J., Ashbeck, E.L., Thomson, C.A., Gerner, E.W., Thompson, P., 2014. A dietary polyamine intake and polyamines measured in urine. *Nutr. Cancer* 66(7), 1144–1153.

Надійшла до редколегії 25.09.2015