

СТАН Т- і В- КЛІТИННОЇ ЛАНОК ІМУНІТЕТУ КОРІВ . ХВОРИХ НА СУБКЛІНІЧНУ ФОРМУ МАСТИТУ. ЗА ВИКОРИСТАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ

В. Чепурна, Т. Супрович

Подільський державний аграрно-технічний університет

О. Віщур

²Інститут біології тварин НААН

В. Мізик

Подільський державний аграрно-технічний університет

*Наведено результати експериментальних досліджень впливу нового комплексного ліпосомального препарату, виготовленого на основі рослинної сировини – звіробій продірявлений (*Hypericum perforatum L.*), на показники Т- і В-клітинної ланок імунітету крові корів, хворих на субклінічну форму маститу. Встановлено, що у хворих корів на 3-тю добу після введення препарату спостерігали зростання загальної кількості Т- і В-лімфоцитів до рівня величин цього показника у клінічно здорових тварин. Загальна кількість Т-лімфоцитів (активних і теофілін-резистентних) і В-лімфоцитів у крові корів дослідної групи на 9-ту добу після введення препарату була більша ($P < 0,05$), ніж у контрольній. При цьому, кількість Th-РУЛ і ЕАС-РУЛ з низькою щільністю рецепторів у крові корів дослідної групи була більша ($P < 0,01$), а «нульових», недиференційованих у функціональному відношенні клітин – менша ($P < 0,01$), порівняно до контролю.*

Ключові слова: велика рогата худоба, кров, субклінічний мастит, лейкоцити, Т- і В-лімфоцити, соматичні клітини.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Молочне тваринництво є однією з провідних галузей сільськогосподарського виробництва, покликаною повністю задовольнити потреби людей в продуктах харчування тваринного походження. У зв'язку з цим велике значення надається якості виробленого молока [1, 2]. За останніх 20 років виробіток молока зріс на 131,6 млн. т. або 26,9 %. Середній річний надій на корову складає 8000 –10000 кг. Оцінка рівня захворюваності маститами в усьому світі за доступними літературними даними показує, що дана хвороба спостерігається у 48 корів з кожних 100 голів, з яких у 39 виявляється субклінічний перебіг захворювання, а у 9 тварин – клінічний. В Європейському Союзі кількість хворих на мастит корів оцінюється в 6,9 млн. голів, що складає біля 30 % усього дійного стада [3, 4]. За даними вітчизняних авторів, захворювання корів на мастит охоплює від 10 до 70 % поголів'я, а 8–16 % корів хворіють 2 рази і більше протягом лактації [5, 6]. Виникнення маститу залежить не лише від хвороботворного агенту та його потенційної здатності викликати патологічний процес, а й значною мірою від імунобіологічної реактивності організму тварини [7–10]. З даних літератури відомо, що за дії стрес-факторів у корів, хворих на мастит, зменшується

кількість лімфоцитів у крові й підвищується рівень кортизолу в плазмі крові [5, 6]. При лікуванні хворих корів у більшості випадків перевага надається застосуванню антибіотиків і сульфаніламідних препаратів шляхом інтрацистернального введення. Найбільш негативним наслідком застосування антибіотиків при лікуванні корів хворих на мастит, є наявність їх залишків у збірному молоці, що погіршує його технологічні властивості та шкодить здоров'ю людей [7]. З огляду на це за останні роки значно розширились наукові дослідження з використання ліпосомальних препаратів, які у своєму складі не містять антибіотиків, сприяють профілактиці рецидиву захворювання, та максимальному відновленню молочної продуктивності [17, 18]. Ліпосоми – сферичні ліпідні везикули, що зазвичай містять різні фосфоліпіди, специфічні глікопептиди, а також холестерин, який є стероїдним компонентом практично всіх клітинних мембран [11]. Ліпосоми отримують з природних ліпідів, і тому вони нетоксичні, не викликають небажаних імунних реакцій, підлягають біологічній деградації, тобто руйнуються під дією звичайних ензимів, які присутні в організмі і тому їх можна вважати ідеальними переносниками лікарських препаратів [11–13]. Незважаючи на наявність у літературі значної кількості наукових праць, присвячених вивченню етіології, патогенезу, профілактиці та лікуванню різних форм маститів у корів, залишається ще маловивченим питання біохімічних особливостей імунобіологічної реактивності корів, хворих на мастит, за умов застосування нових комплексних ліпосомальних препаратів, які володіють імуномодулюючими властивостями і не містять антибіотиків.

Мета дослідження полягала у з'ясуванні дії нового комплексного ліпосомального препарату, розробленого Інститутом біології тварин НААН, на кількість і функціональну активність Т- і В-лімфоцитів крові корів, хворих на субклінічну форму маститу.

Матеріали і методи досліджень. Експериментальні дослідження проведено у ТОВ «Лани Вінковеччини» Хмельницької області, на двох групах корів, які за принципом аналогів були розділені на контрольну (здорові тварини) та дослідну групи (з ознаками субклінічного маститу) по 10 тварин у кожній. Для визначення здорової та ураженої чверті вим'я використовували каліфорнійський маститний тест [12, 15]. Коровам дослідної групи інтрацистернально в уражені чверті вимені тричі з інтервалом 24 години вводили ліпосомальний препарат – перша доба 10 см³, наступні дві доби 5 см³. У здорові чверті молочної залози профілактично вводили половину лікувальної дози. Перед застосуванням препарату з усіх чвертей вимені видоювали молоко та продезінфіковували дійку. Після введення препарату проводили масаж молочної залози для його рівномірного розподілу. Корови були переведені на ручне доїння. Новий комплексний ліпосомальний препарат містить у своєму складі: витяжку із звіробію продірявленого, вітаміни А, D₃, Е, лецитин, твін – це антибактеріальний препарат, активний щодо грампозитивних бактерій, в тому числі таких як *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae*. Протизапальну дію обумовлено наявністю в препараті флавоноїдів. Має

здатність загоювати поверхню рани і стимулює регенерацію тканин. Кров для проведення імунологічних досліджень у корів відбирали до ранішньої годівлі на 1-шу добу (перед введенням препарату) і на 3-тю та 9-ту доби після його застосування. У стабілізованій гепарином крові визначали загальну кількість лейкоцитів, Т-лімфоцитів (Е-РУЛ) – у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана (Jondal M. et al., 1972) у модифікації О. І. Віщур зі співавт. (2008), їх субпопуляції – Т-хелпери (ТФР Т-лімфоцити; Суrowас В. М. зі співавт., 1980); кількість «активних» Т-РУЛ (Wansbrough-Jones M. et al., 1979); кількість Т-клітин з переважно супресорною активністю (ТФЧ; Т-лімфоцити) — шляхом віднімання числа теофілінрезистентних Т-клітин (ТФР) від загальної кількості Т-лімфоцитів, В-лімфоцити (ЕАС-РУЛ) – у реакції комплементарного розеткоутворення з еритроцитами барана (Чернушенко Е. Ф. зі співавт., 1979). При підрахунку кількості Т- і В-лімфоцитів та їх регуляторних субпопуляцій на фіксованих і фарбованих мазках крові визначали лімфоцити із низькою (3–5) і середньою (6–10) щільністю рецепторів, а також недиференційовані у функціональному відношенні лімфоцити. Одержані дані опрацьовано методами тривіальної статистики програмного пакету Microsoft Excel.

Результати досліджень. Важливе значення при визначенні імунного статусу організму має вивчення кількісного складу Т- і В-лімфоцитів, як провідних імунокомпетентних клітин крові, оскільки вони характеризують рівень захисних сил організму тварин, стан специфічного імунітету та зберігають чутливість до антигенів збудника хвороби навіть при прихованій формі перебігу [14]. Результати досліджень кількості лейкоцитів, Т- і В-лімфоцитів у периферичній крові корів наведені у табл.1. Встановлено, що захворювання корів на субклінічний мастит призводить до зростання кількості лейкоцитів у крові. Зокрема у хворих корів кількість лейкоцитів до введення і на 3-тю добу після введення досліджуваного препарату була відповідно на 45,2 % ($P < 0,01$) і 34,2 % ($P < 0,05$) більша, ніж у клінічно здорових тварин. При цьому у хворих корів констатовано зменшення кількості Т- і В-лімфоцитів у периферичній крові. Зокрема, у корів з субклінічним маститом зафіксовано зменшення ($P < 0,05$) кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілінрезистентних), що спричинило зниження ($P < 0,05$) імунорегуляторного індексу. Щодо ступеня диференціації вказаних імунокомпетентних клітин, то зміни їх кількості у крові хворих корів відбувалися на тлі зменшення ($45,2 \pm 1,02$ (%) проти $50,2 \pm 1,74$ (%), ($P < 0,05$)) ТЕ-РУЛ із низькою щільністю рецепторів і збільшення «нульових», недиференційованих у функціональному відношенні загальних і теофілінрезистентних Т-лімфоцитів ($41,6 \pm 1,47$ (%) проти $37,2 \pm 0,62$ (%), ($P < 0,05$)). Подібні зміни виявлено при дослідженні кількості ТА-РУЛ і антигензв'язуючих В-лімфоцитів крові. Проте різниці порівняно до контролю були не вірогідні.

Важливе діагностичне значення за умов захворювання має визначення співвідношення між теофілінрезистентними (Th) і теофілінчутливими (Ts) Т-лімфоцитами крові – імунорегуляторний індекс (ІРІ) [14]. У корів, хворих на СМ, зафіксовано зниження ІРІ ($2,71 \pm 0,17$ проти $3,48 \pm 0,1$, ($P < 0,05$)).

Таблиця 1. Відносна кількість Т- і В-лімфоцитів та їх субпопуляцій у крові корів ($M \pm m$; $n=10$)

Показники	Групи тварин	Період досліджень		
		до введення препарату	3-тя доба лікування	9-та доба від початку лікування
Лейкоцити, Г/л	К	7,3±0,58		
	Д	10,6 ±0,53**	9,8±0,54*	8,0±0,71°
ТЕ-РУЛ,0	К	37,2±0,62		
	Д	41,6±1,47*	32,0±0,82***°°	34,5±0,67*°°
3-5	К	50,2±1,74		
	Д	45,2±1,02*	50,6±1,03°°	53,2±0,43°°°
6-10	К	12,3±0,47		
	Д	12,2±1,09	13,3±0,28	12,2±0,63
М	К	0,3±0,21		
	Д	1,0±0,32	0	0
%	К	62,8±1,12		
	Д	58,4±1,18*	64,5±1,47°	65,4±1,74°
ТА-РУЛ,0	К	58,6±1,81		
	Д	62,3±1,17	55,1±0,83***°°	56,6±1,8°
3-5	К	32,0±0,47		
	Д	31,4±0,57	33,4±0,87	36,4±0,78°°°
6-10	К	5,0±0,79		
	Д	6,3±0,47	8,0±0,67*	7,6±0,57*
%	К	40,4±1,79		
	Д	37,7±1,87	41,4±1,47	44,4±1,57°
Th-РУЛ,0	К	51,2±1,63		
	Д	57,3±1,76*	48,2±0,78°°°	47,6±1,75°°
3-5	К	41,2±1,58		
	Д	36,2±0,75	41,4±0,79°°°	46,2±0,83°°°
6-10	К	6,7±0,37		
	Д	6,5±0,4	7,4±0,41	6,2±0,42
%	К	48,8±1,43		
	Д	42,7±1,56*	50,8±1,58°°	52,4±0,75°°°
Ts супресори	К	14,0±0,61		
	Д	15,7±0,75	13,7±0,58	13,05±1,08
ІРІ	К	3,48±0,1		
	Д	2,71±0,17*	3,7±0,29°	4,01±0,22°°°
ЕАС-РУЛ,0	К	60,0±1,68		
	Д	62,1±0,51	57,5±0,89°°°	54,2±0,97*°°°
3-5	К	35,4±0,87		
	Д	33,4±0,87	35,3±0,81	38,5±0,8*°°
6-10	К	4,6±0,47		
	Д	4,5±0,47	7,2±0,43***°°	5,2±0,48
%	К	40,3±1,68		
	Д	37,9±0,87	42,5±1,81	43,7±1,87°

Примітка: ° – $P < 0,05$, °° – $P < 0,01$, °°° – $P < 0,001$ — вірогідність у тварин даної групи порівняно з показниками до введення препарату (1-ої доби експерименту); * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ – різниця вірогідна порівняно до показників контрольної групи.

Результати цих досліджень свідчать про те, що у корів, хворих на субклінічний мастит, клітинна ланка специфічної імунної відповіді реагувала збільшенням абсолютної кількості лейкоцитів і зменшенням відносної кількості та функціональної активності Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-резистентних) за рахунок перерозподілу рецепторного апарату імунокомпетентних клітин. На такому фоні змін відмічається Т-лімфоцитопенія, яка виникає при СМ і може бути обумовлена зменшенням числа переадаптованих лімфоцитів у периферичній крові внаслідок їх міграції з судинного русла в лімфоїдну тканину.

Інтрацистернальне введення коровам дослідної групи ліпосомального препарату сприяло нормалізації кількості Т- і В-лімфоцитів у крові. Про що вказує зростання загальної кількості Т- і В-лімфоцитів і підвищення ІРІ у крові корів дослідної групи до рівня величин цього показника у клінічно здорових тварин. При цьому, у крові корів дослідної групи на 3-тю і 9-ту доби експерименту кількість ТА-РУЛ і ЕАС-РУЛ з середньою щільністю рецепторів була більша ($8,0 \pm 0,67(\%)$ і $7,6 \pm 0,57(\%)$ проти $5,0 \pm 0,79(\%)$, ($P < 0,05$)), а також ($7,2 \pm 0,43(\%)$ і $5,2 \pm 0,48(\%)$ проти $4,6 \pm 0,47(\%)$, ($P < 0,01$)). А «нульових», недиференційованих у функціональному відношенні ТА-РУЛ – менша, порівняно до контролю ($55,1 \pm 0,83(\%)$ і $56,6 \pm 1,8(\%)$ проти $58,6 \pm 1,81(\%)$, ($P < 0,05$)). Разом з цим необхідно зауважити, що вказані зміни кількості Т- і В-лімфоцитів у крові корів дослідної групи були виражені більшою мірою на 9-ту добу після введення препарату.

Отже, отримані результати досліджень свідчать, що введення коровам, хворих на мастит з субклінічною формою перебігу, досліджуваного препарату спричиняє нормалізуючий вплив на Т- і В-клітинну ланку імунної відповіді організму. Про що вказує зниження абсолютної кількості лейкоцитів, збільшення кількості Т- і В-лімфоцитів крові та підвищення їх функціональної активності. Ці зміни ймовірно обумовлені комплексною стимулювальною дією складників препарату на процеси активації, кооперації і диференціації імунокомпетентних клітин у формуванні імунної відповіді в організмі корів, хворих на СМ. Лімфоцити – основна категорія імунокомпетентних клітин, які реагують не на будь-які антигени, а лише на ті, з якими організм зустрічався. Це і обумовлює зростання їх кількості у крові корів за умов використання досліджуваного препарату [11,14]. Поряд з цим необхідно зауважити позитивний вплив препарату на функціональну активність імунокомпетентних клітин, що обумовлено версифікованим впливом біологічно-активних сполук у його складі на рецепторний апарат Т- і В-лімфоцитів крові.

Висновки. Захворювання корів на субклінічний мастит призводить до зростання кількості лейкоцитів у крові. При цьому у хворих корів констатовано зменшення кількості Т-активних і теофілін-резистентних Т-лімфоцитів крові та збільшення «нульових», недиференційованих у функціональному відношенні Т-лімфоцитів. Інтрацистернальне введення коровам, хворих на мастит з субклінічною формою перебігу, нового комплексного ліпосомального препарату спричиняє зменшення кількості лейкоцитів, збільшення Т-лімфоцитів (активних і теофілін-

резистентних) і В-лімфоцитів та підвищує їх функціональну активність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Petrov P., Zhukova Y., Yuriy D. The Effects of Dairy Management on Milk Quality Characteristics. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 2016. Vol. 4, Issue 9. P. 782–786. doi: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i9.782-786.745>
2. Бородиня В. І., Гончаренко В. Б. Ефективність лікування корів, хворих субклінічним маститом, препаратами для внутріцистернального застосування. Наукові праці Південного філіалу Національного університету біоресурсів і природокористування України "Кримський агротехнологічний університет". Сер.: Ветеринарні науки. 2013. Вип.151. С. 48–154.
3. Joshi S., Gokhale S. Status of Mastitis as an Emerging Disease in Improved and Periurban Dairy Farms in India. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006. Vol. 1081, Issue 1. P. 74–83. doi: 10.1196/annals.1373.007
4. Rumar A. V., Hamza P. A., Choudhuri P. C. Economic implications of treating subclinical mastitis. *Indian Journal of Dairy Science*. 1996. Vol.7, № 8. P. 459–641.
5. Супрович Т. М., Паневник В. В. Етіологічні чинники маститів корів української чорно-рябої молочної породи. Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2016. Т.18. №3(70). С.191–195. doi: <https://doi.org/10.15421/nvlvet7046>
6. Schwarz D., Diesterbeck U. S., König S., Brügemann K., Schlez K., Zschöck M. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 94, Issue 10. P. 5033–5044. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4348>
7. Любецький В. Й., Вальчук О. А. Розповсюдження маститу серед високопродуктивних корів. Київ : Наук. вісн. НАУ, 2005. №89. С. 294-297.
8. Barbano D. M., Galton D. M., Rudan M. A., Boor K. J. Effects of Somatic Cell Count on Quality and Shelf-Life of Pasteurized Fluid Milk. *Journal of Dairy Science*. 2000. Vol. 83, Issue 2. P.264–274. doi:10.3168/jds.s0022-0302(00)74873-9.
9. Палій А. П. Інноваційні основи одержання високоякісного молока: монографія. Харків: Міськдрук, 2016. 270 с.
10. Suprovych T. M., Suprovych M. P., Koval T. V., Karchevska T. M., Cherpurna V. A., Chornyi I. O., Berezhanskyi A. P. BoLA-DRB3 gene as a marker of susceptibility and resistance of the Ukrainian black-pied and red-pied dairy breeds to mastitis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2018, Vol. 9(3), P. 363–368. doi: 10.15421/021853
11. Чепурна В. А., Супрович Т. М., Віщур О. І., Коваленко В. Л. Лейкоцитарний та біохімічний профіль крові корів, хворих на клінічний мастит, за дії ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. Вип.32(1). С.307–311.
12. Барсуков Л. И. Липосомы. Сорос. образов. журн. 1998. №10. С.12–19.
13. Кобринский Г. Л. Липосомы в медицине. Наука и жизнь. 1988. №6.

C.23–30.

14. Собко Г.В. Вплив препарату «Антимаст» на стан Т- і В-клітинної ланок імунітету корів, хворих на субклінічну форму маститу. Біологія тварин, 2016, т. 18, № 4. С. 86–92. doi: 10.15407/animbiol18.04.086

15. O’Driscoll K., Boyle L., French P., Meaney B., Hanlon A. The effect of out-wintering pad design on dirtiness score, somatic cell score and mastitis incidence in dairy cows. *Animal*. 2008. Vol. 2(6). P. 912–920. doi: 10.1017/s1751731108001882

16. Bhutto A. L., Murray R. D., Woldehiwet Z. California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*. 2012. Vol. 92, Issue 1. P. 13–17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.006>

17. Owens W. E., Nsckerson S. C., Doddie R. L., Watts J. L. Combination therapy increases cure rates for bovine mastitis. *Louisiana Agriculture*. 1990. Vol.20, №2. P. 6–7.

18. Рубцов В.И. Профилактика и лечение мастита у коров. *Ветеринарная медицина*. 2006. №9. С.32–35.

СОСТОЯНИЕ Т-и-В- КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНЬЕВ ИММУНИТЕТА У КОРОВ, БОЛЬНИХ СУБКЛИНИЧЕСКОЙ ФОРМОЙ МАСТИТА , ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА

Чепурная В., Супрович Т., Вищур О., Мизык В.

*Приведены результаты экспериментальных исследований влияния нового комплексного липосомального препарата изготовленного из растительного сырья (*Hypericum perforatum L.*), на показатели Т- и В-клеточного звеньев иммунитета крови коров, больных на субклиническую форму мастита. Установлено, что у больных коров на 3-и сутки после введения препарата наблюдали рост общего количества Т- и В-лимфоцитов до уровня величин этого показателя у клинически здоровых животных. Общее количество Т-лимфоцитов (активных и теофиллин-резистентных) и В-лимфоцитов в крови коров опытной группы на 9-е сутки после введения препарата было больше ($P < 0,05$), чем в контрольной. При этом, количество Th-РУЛ и ЕАС-РУЛ с низкой плотностью рецепторов в крови коров опытной группы было больше ($P < 0,01$), а «нулевых», недифференцированных в функциональном отношении клеток – меньше ($P < 0,01$), по сравнению с контролем.*

Ключевые слова: крупный рогатый скот, кровь, субклинический мастит, лейкоциты, Т- и В-лимфоциты, соматические клетки.

CONDITION OF T-AND-B CELLULAR LINKS OF IMMUNITY IN COWS, THE SICK SUBCLINIC FORM OF MASTITIS, WHEN USING A LIPOSOMAL DRUG

Chtpurna V., Suprovych T., Vishchur O., Mizyk V.

*The article presents the results of experimental research on the impact of complex liposomal drug produced on the basis of plant material - *Hypericum perforatum L.*, on the indices of the T- and B-cell lines of blood immunity in cows*

suffering from subclinical mastitis.

It was established that the growth of the total number of T and B lymphocytes to the level of the values of this indicator in clinically healthy animals was observed in sick cows on the 3rd day after drug administration. The total number of T-lymphocytes (active and theophylline-resistant) and B-lymphocytes in the blood of cows of the experimental group at day 9 after administration of the drug was greater ($P < 0.05$) than in the control. At the same time, the number of Th-RUL and EAS-RUL with low receptor density in the blood of cows of the experimental group was greater ($P < 0.01$), and of "null" nondifferentiated cells functionally less ($P < 0.01$). compared to control.

Key words: cattle, blood, subclinical mastitis, leukocytes, neutrophils, T- and B-lymphocytes, somatic cells.