

В. Головань, асп., Е. Андрійчук, канд. біол. наук, І. Будзанівська, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ВИРУСОВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОТОПОВ МХА И ПОЧВЫ АНТАРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

К настоящему времени исследования многочисленных биологических объектов – фагов, является мизерной по сравнению с другими биологическими представителями микро- и макромира. Их свойства хорошо изучены лишь для небольшого числа так называемых "модельных бактериофагов". В то же время, выделение фагов с экосистем, функционирующих в условиях низких температур, представляет значительный научный интерес и имеет определенные методические сложности. Целью исследования было изучение разнообразия вирусов бактерий, выделенных из биотопов мха и почвы антарктических растений. Методы: выделение бактериофагов из образцов мха и почвы, титрования методом по Грациа, накопления фагов в жидкой питательной среде с принудительной аэрацией, электронная микроскопия, статистические методы. Результаты проведения выделения вирусов бактерий (бактериофагов) с биотопов мха и почвы. Описана морфология негативных колоний и вирусных частиц, полученных из изолятов фагов. Начало образования негативных колоний наблюдался через 5–7 суток, в других через 7–10 суток. Заканчивалось их формирования еще через 10–12 суток. Дольше всего формирование негативных колоний происходило именно на антарктических штаммах бактериальных культур. Установлено их таксономическую принадлежность. Выявленные вирусные частицы были представлены различными морфотипами, присущие вирусам, которые относятся к семействам: Myoviridae, Podoviridae и Siphoviridae порядка Caudovirales. Выводы: выделены изоляты фагов к чувствительным бактериям. Описано разнообразие бактериофагов, которое свидетельствует о таксономическом различии бактериофагов в наземных биотопах островов Аргентинского архипелага. Создана коллекция изолятов бактериофагов с их характеристикой.

Ключевые слова: Антарктида, вирусы бактерий (бактериофаги), вирусные частицы.

V. Holovan, Ph. D. stud., O. Andriichuk, Ph. D., I. Budzanivska, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INVESTIGATION OF DIVERSITY OF BACTERIAL VIRUSES, ISOLATED FROM MOSS AND SOIL BIOTOPS OF ANTARCTIC REGION

Until now, there is a little number of scientifically investigated phages, in comparison to other biological representatives of the micro and macro world. Their properties are well studied only for a small number of so-called model bacteriophages. At the same time, the extraction of phages from ecosystems that function in low temperatures represents considerable scientific interest and has some methodological difficulties. The aim of the research was to study the diversity of viruses of bacteria isolated from the moss and soil of Antarctic plants. Methods: isolation of bacteriophages from moss and soil specimens, titration by the Gratia method, accumulation of phages in a liquid nutrient medium with forced aeration, electron microscopy, statistical methods. Results: The isolation of bacterial viruses (bacteriophages) from moss and soil biotops has been carried out. The morphology of negative colonies and viral particles of obtained phage isolates is described. Start of the negative colonies formation was observed in 5–7 days, in others after 7–10 days. Their formation was completed after 10–12 days. The longest formation of negative colonies occurred precisely on strains of Antarctic bacterial cultures. Their taxonomic diversity is established. The detected viral particles were represented by different morphotypes, which are typical for the viruses of the families Myoviridae, Podoviridae and Siphoviridae of the Caudovirales order. Conclusions: isolates of phages to sensitive bacteria were extracted. A description of the diversity of bacteriophages has been made, which shows the taxonomic diversity of bacteriophages in the terrestrial biotopes of the islands of the Argentine archipelago and collection according to their characteristics was created.

Key words: Antarctica, bacterial viruses (bacteriophages), viral particles.

УДК:612.111.33: 577.19(16)

Л. Дяченко, асп., Л. Степченко, канд. біол. наук
Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

ОЦІНКА ВИКОРИСТАННЯ КОРМОВИХ ДОБАВОК ГУМІНОВОЇ ПРИРОДИ ЗА ЛЕЙКОЦИТАРНИМИ ІНДЕКСАМИ У ЩУРІВ ПІСЛЯ КОМБІНОВАНОГО СТРЕСУ

У відповідь на дію стрес-факторів різного ґенезу в живому організмі запускається каскад адаптивних реакцій, які можуть нівелювати функціональні порушення гомеостазу. Комбінування впливу різних стрес-факторів може викликати надмірне утворення та накопичення активних форм кисню, що тягне за собою цілу низку патологічних станів, які створюють передумови для розвитку великої кількості захворювань. Одним з показників розвитку адаптації та інтегральним показником стану організму вважається система крові, особливо, лейкоцитарна формула, перерозподіл якої дає змогу проаналізувати характер впливу та оцінити інтенсивність адаптивних процесів в організмі за рахунок функцій, які виконують різні форми лейкоцитів. Лейкоцитарні індекси, в яких використовували параметри лейкоцитарної формули, дають змогу оцінити ступінь ендогенної інтоксикації, розвитку резистентності та характер клітинного імунітету за впливу стрес-факторів на організм тварин та людини. Тому, у статті розглянуто можливість оцінки превентивного впливу природних антиоксидантів гумінової природи за лейкоцитарними індексами на організм щурів на тлі водно-імобілізаційного комбінованого стресу (ВІКС). Для цього тварин розділили на п'ять груп по 6 тварин: 1- група інтактні тварини (контроль); 2-5 – дослідні групи. Тварини всіх дослідних груп додатково отримували перорально, індивідуально за допомогою зонду впродовж 18 діб воду, кормові добавки "Гумілід" (в розрахунок 5 мг/кг маси тіла за діючою речовиною), "Еко – Імпульс Animal" (з розрахунок 2,5 мг/кг маси тіла) та вітамін Е (в розрахунок 50мг/кг маси тіла). У тварин 2, 3, 4 та 5 груп моделювали стрес. Встановлено, що за дії водно-імобілізаційного комбінованого стресу к крові щурів відбувається зростання клітин лейкоцитарного ряду, головним чином за рахунок збільшення еозинофілії та паличкоядерних нейтрофілів. Використання у достресовий період природного антиоксиданту, кормової добавки "Гумілід" викликає зменшення кількості лейкоцитів на 41% у порівнянні зі значеннями у тварин, які в цей період отримували очищену воду та не відрізнялась від значень у інтактних тварин. Зміна лейкоцитарних індексів вказує на функціональні зміни в організмі та наявність нейтрофільного зсуву на тлі ВІКС у щурів. Також, дія ВІКС призводить до виходу в кров'яне русло більш молодих форм нейтрофілів, збільшенню як процентної частки еозинофілії, так і кількісної. За превентивного використання кормових добавок гумінової природи "Гумілід" та "Еко-Імпульс Animal" та вітаміну Е досліджувані показники наближаються до значень контрольної групи.

Ключові слова: лейкоцити, "Гумілід", "Еко-імпульс animal", стрес.

Вступ. Вплив будь-якого типу стресу (психологічного, імобілізаційного, хімічного, фізичного та ін.) на тварин, супроводжується короткочасною чи довготрива-

лою активацією окисних процесів, які в свою чергу запускають каскадні реакції адаптації, що необхідні для пристосування та нормального функціонування живого

організму (Garkavy L.H. 2007). Одним з показників розвитку адаптації та інтегральним показником стану організму вважається система крові, особливо, лейкоцитарна формула, перерозподіл якої дає змогу проаналізувати характер впливу та оцінити інтенсивність адаптивних процесів в організмі за рахунок функцій, які виконують різні форми лейкоцитів (Akimova V.M. 2015). Лейкоцитарні індекси в яких використовували параметри лейкоцитарної формули, вважаються показниками, які характеризують ступінь ендogenous інтоксикації, розвитку резистентності та характер клітинного імунітету за впливу стрес-факторів на організм тварин та людини. Ці індекси мають діагностичне та прогностичне значення, дають змогу оцінити роботу ефektorних механізмів імунної системи, а також рівень імунологічної реактивності, яка визначає процес формування неспецифічних адаптаційних реакцій в організмі.

З метою стимуляції клітинного імунітету організму застосовуються різноманітні засоби, наприклад вітаміни (Efimov V.G. 2015, Belay I.M. 2001) та мікроелементи (Griban V.G. 2008). Серед численної кількості біологічно-активних речовин (БАР), які можуть підвищувати рівень неспецифічної резистентності організму за дії стрес-факторів, особливої уваги заслуговують гумінові речовини з біобезпечного торфу. Вони є продукти багатостадійної трансформації живого у природі, та збереження органічної речовини та енергії від дисипації та можуть впливати на фізіолого-біохімічний статус тварин (Stepchenko L.M. 2006-2018, Buchko O.M. 2013, Mikhailenko E.O. 2017, Efimov B.G. 2015) та на лейкоцитарний ряд клітин (Efimov V.G. 2009). В попередніх дослідженнях виявили біологічний ефект та встановили оптимальні кількості кормових добавок "Гумілід" та "Еко-Імпульс Animal" задієючою речовиною, які мали позитивну біологічну дію на організм щурів (Diachenko L.M., Stepchenko L.M. 2017, 2018). Однак, що стосується оцінки впливу цих речовин у складі різних кормових добавок гумінової природи на лейкоцитарні індекси на тлі водно-імобілізаційного комбінованого стресу (ВІКС), дослідження не проводились.

Тому, метою даного експерименту було дослідження впливу природних антиоксидантів кормових добавок гумінової природи "Гумілід" та "Еко-Імпульс Animal" на лейкоцитарні індекси крові щурів на тлі впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили на білих статевозрілих молодих щурах-самцях масою тіла 180-200 г на базі віварію. Впродовж усього експерименту щурів утримували за стандартними умовами, з вільним доступом до води та корму.

Тварин було поділено на п'ять груп по 6 тварин у кожній: 1- група інтактні тварини (контроль); 2-5 – дослідні групи. Щурів 2 групи утримували за стандартних умов та для чистоти експерименту давали додатково очищену воду; 3 – щури, які отримували додатково до раціону, водний розчин природного антиоксиданту кормової добавки гумінової природи (ПАО КДГП) "Гумілід" (ТУ У 15.7-00493675004 2009) в кількості 5 мг/кг маси тіла, 4 – тварини, які отримували додатково до раціону, водний розчин кормової добавки "Еко-Імпульс Animal" (ТУ У 10.9-00493675-008 2016) з розрахунку 2,5 мг/кг маси тіла, тварини 5 групи отримували масляний розчин вітаміну Е в кількості 50 мг/кг маси тіла (Diachenko and Stepchenko., 2017, 2018) Тваринам всіх експериментальних груп воду, кормові добавки та вітамін Е відповідно, вводили перорально, індивідуально впродовж 18 діб. Після чого у тварин 2, 3, 4 та 5 груп моделювали стрес. За основу було взято модель водно-імобілізаційного стресу (Takagi K. And Okabe, 1968; Weiner, 1996) в ком-

бінації з моделлю емоційного стресу, за рахунок чого був досягнутий ефект комбінованого стресу.

Кров для досліджень забирали з хвостової вени (на початку експерименту) та під тіопенталовим наркозом (60 мг/кг) та з серця (правого шлуночка) на наступний день після моделювання стресу. У стабілізованій крові щурів визначали лейкоцитарну формулу на автоматичному гематологічному аналізаторі Automated Veterinary Hematology Analyzer PCE 90Vet (HighTechnologyInc., США) на базі Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК.

Розрахунковим методом отримані наступні індекси (ЛІ):

$$ЛІ = \frac{(4 \cdot \text{мол} + 3 \cdot \text{юн} + 2 \cdot \text{палочкояд} + 1) + \text{сегм} \cdot (0 - 1))}{(\text{лімф} + \text{мон}) \cdot (\text{еоз} + 1)}$$

– індекс співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНЛ): $ІСНЛ = \frac{\text{нейтр}}{\text{лімф}}$;

– індекс резистентності (ІР): $ІР = \frac{\text{лімф}}{\text{сегм.нейтр}}$;

– індекс нейтрофільного зсуву (ІНЗ): $ІНЗ = \frac{(\text{мол} + \text{юн} + \text{палочкояд})}{\text{сегмент}}$;

– індекс співвідношення нейтрофілів до моноцитів (ІСНМ): $ІСНМ = \frac{\text{нейтр}}{\text{моноц}}$

– індекс співвідношення лімфоцитів до моноцитів (ІСЛМ): $ІСЛМ = \frac{\text{лімф}}{\text{моноц}}$

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

Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стюдента. Результати вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення. Клітини лейкоцитарного ряду по різному реагують на вплив стрес-факторів, а їх перерозподіл може характеризувати стадію стресу, яку проходить організм тварини. На наступний день після моделювання ВІКС у тварин 2 групи на 21 добу експерименту (Табл. 1), було зареєстровано підвищення загальної кількості лейкоцитів на 75% ($p < 0,001$) у порівнянні з інтактними щурами. При цьому, підвищення загальної кількості лейкоцитів у цих щурів після дії ВІКС відбувалось, головним чином, за рахунок зростання відсотку еозинофілів та паличкоядерних нейтрофілів у 1,5 рази ($p < 0,001$) та у 2 рази ($p < 0,05$) відповідно. Одночасно, у тварин 2 групи відмічається зниження процентної кількості лімфоцитів на 12% ($p < 0,05$) у порівнянні з інтактними тваринами. Абсолютне значення кількості еозинофілів та паличкоядерних нейтрофілів теж зросло у 4,6 рази ($p < 0,001$) та у 3,4 рази ($p < 0,001$) відповідно. Хоча, відсоток сегментноядерних нейтрофілів достовірно не відрізнявся від значень у інтактних тварин, абсолютне їх значення було достовірно вищим на 98% ($p < 0,05$). Кількість лімфоцитів, навпаки, зменшувалась на 53% ($p < 0,05$) у порівнянні з цим значенням у тварин 1 групи. Отже, отримані зміни кількості лейкоцитів та процентного співвідношення клітин лейкоцитарного ряду у крові щурів підтверджують їх здатність реагувати на дію ВІКС. За дії ВІКС стимулюється вихід молодих форм клітин нейтрофілів та активується робота червоного кісткового мозку, що може призводити до виходу в кровоток більшої кількості різних за віком нейтрофілів для більш швидкого підвищення захисних властивостей крові тварин. За впливу стрес-факторів відбувається активація фагоцитарних клітин – моноцитів. Кількість моноцитів у

тварин всіх досліджуваних груп знаходиться в межах референтних значень, але у тварин 2 групи було зареєстровано недостовірне зростання на 45%.

В той же час, загальна кількість лейкоцитів у тварин 3 групи, які отримували природній антиоксидант кормову добавку "Гумілід" була меншою на 41% ($p<0,001$) у порівнянні зі значеннями у тварин 2 групи на наступний день після дії ВІКС, та достовірно не відрізнялась від значень у інтактних тварин. Процент еозинофілів та сегментноядерних нейтрофілів у крові щурів 3 групи зростав на 80 % ($p<0,05$) та на 67 % ($p<0,05$) та на у порівнянні з тваринами 1 групи. Абсолютні значення еозинофілів, паличкоядерних та сегментноядерних нейтрофілів у крові щурів 3 групи після використання ПАО КДГП "Гумілід" на тлі ВІКС були достовірно нижчими у 58% ($p<0,01$), на 52% ($p<0,001$) та на 37% ($p<0,01$) відповідно у порівнянні з тваринами 2 групи. В свою чергу, порівнюючи абсолютне значення лімфоцитів у крові щурів 3 групи з тваринами 2 групи, було зафіксовано зменшення на 43 % ($p<0,001$). Ефект лімфоцитопенії може бути викликаний міграцією або руйнацією цих клітин на тлі дії стрес-факторів. Саме лімфоцити є головними клітинними компонентами імунної системи організму, які відповідають за розпізнання чужорідних агентів та приймають участь у адекватній імунній відповіді організму тварин.

У щурів 4 групи, які отримували кормову добавку "Еко-Імпульс Апімал" загальна кількість лейкоцитів зменшилась на 60% ($p<0,001$) у порівнянні зі значеннями у тварин 2 групи, та на 30 % ($p<0,05$) відрізнялась від значень у тварин 1 групи. Кількість сегментноядерних нейтрофілів у тварин 4 дослідної групи, яким у до стресовий період додатково до раціону додавали кормову добавку "Еко-Імпульс Апімал" підвищилась на 22% ($p<0,05$) у порівнянні з тваринами 1 групи. Процент еозинофілів, сегментноядерних та паличкоядерних ней-

трофілів у крові щурів 4 групи зростав на 80 % ($p<0,05$), на 20 % ($p<0,05$) та на 67 % ($p<0,05$) у порівнянні з тваринами 1 групи. Абсолютні значення еозинофілів, паличкоядерних та сегментноядерних нейтрофілів у крові щурів 4 групи після використання КДГП "Еко-Імпульс Апімал" на тлі ВІКС були достовірно нижчими на 74% ($p<0,001$), на 67% ($p<0,001$) та на 57% ($p<0,001$) відповідно у порівнянні з тваринами 2 групи. В той же час, абсолютне значення лімфоцитів у крові щурів 4 групи було меншими на 40 % ($p<0,001$) у порівнянні з інтактними тваринами та на 61% у порівнянні з результатами у тварин 2 групи. За впливу стрес-факторів відбувається активація фагоцитарних клітин – моноцитів. Кількість моноцитів у тварин всіх досліджуваних груп знаходиться в межах референтних значень. Але у тварин 4 групи, спостерігалось зниження кількісного вмісту моноцитів на 53% ($p<0,05$) у порівнянні з тваринами 1 групи та на 67% ($p<0,01$) у порівнянні з тваринами 2 групи. Моноцитоз може вказувати на формування гострого запалення на тлі впливу комбінованого стресу. Активовані моноцити відіграють важливу роль в регуляції запальних процесів та формуванні синдрому критичного стану

У тварин 5 групи, які додатково до раціону отримували Вітамін Е кількість лейкоцитів достовірно зменшувалась на 43% ($p<0,001$) відповідно у порівнянні з тваринами 2 групи, але отримані значення знаходились в межах контрольних значень. В той же самий час, кількісні значення різних форм лейкоцитів достовірно зменшувались, а саме еозинофіли на 65% ($p<0,01$), паличкоядерні та сегментноядерні нейтрофіли на 64% ($p<0,001$) та на 45% ($p<0,001$) відповідно, лімфоцити на 37% ($p<0,001$), а моноцити на 53% ($p<0,05$) у порівнянні зі щурами 2 групи.

Таблиця 1. Лейкоцитарна формула крові щурів за умов використання кормових добавок гумінової природи та вітаміну Е на тлі комбінованого стресу ($M \pm m$, $n=6$)

Група, №	1	2	3	4	5
Лейкоцити, 10^9 /л	$5,84 \pm 0,535$	$10,24 \pm 0,376^{***}$	$6,00 \pm 0,608^{###}$	$4,1 \pm 0,554^{*###\circ}$	$5,88 \pm 0,481^{###}$
Базофіли	%	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
	10^9 /л	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Еозинофіли	%	$1,00 \pm 0,000$	$2,60 \pm 0,327^{***}$	$1,80 \pm 0,306^*$	$1,80 \pm 0,306^*$
	10^9 /л	$0,06 \pm 0,005$	$0,268 \pm 0,037^{****}$	$0,113 \pm 0,029^{##}$	$0,071 \pm 0,012^{###}$
Паличкоядерні нейтрофіли	%	$1,80 \pm 0,306$	$3,60 \pm 0,327^{**}$	$3,00 \pm 0,365^*$	$3,00 \pm 0,365^*$
	10^9 /л	$0,127 \pm 0,016$	$0,359 \pm 0,020^{***}$	$0,174 \pm 0,017^{*###}$	$0,121 \pm 0,017^{###}$
Сегментноядерні	%	$36,11 \pm 2,416$	$40,20 \pm 1,275$	$43,00 \pm 4,683$	$43,40 \pm 0,757^*$
	10^9 /л	$2,08 \pm 0,210$	$4,123 \pm 0,217^{*ooo}$	$2,602 \pm 0,386^{##}$	$1,773 \pm 0,186^{###}$
Лімфоцити	%	$58,32 \pm 2,422$	$51,30 \pm 1,136^*$	$50,40 \pm 4,386$	$50,20 \pm 0,783^{**}$
	10^9 /л	$3,43 \pm 0,376$	$5,25 \pm 0,211^{*ooo}$	$3,00 \pm 0,293^{###}$	$2,066 \pm 0,241^{*###\circ}$
Моноцити	%	$2,40 \pm 0,200$	$2,00 \pm 0,258$	$1,80 \pm 0,306$	$1,60 \pm 0,327$
	10^9 /л	$0,145 \pm 0,023$	$0,209 \pm 0,026$	$0,111 \pm 0,021^{\#}$	$0,068 \pm 0,021^{*##}$

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,05$; ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,01$; *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,001$; # – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,05$; ## – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,01$; ### – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,001$; ° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,05$; °° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,01$; °°° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,001$

Аналіз лейкоцитарної формули крові досліджуваних щурів виявив особливу чутливість у клітин гранулоцитарного ряду до впливу стрес-факторів. Для детальної ін-

терпретації отриманої лейкоцитарної формули розраховували лейкоцитарний індекс (ЛІ). За впливу стресу у тварин 2 групи спостерігалось зниження ЛІ на 24 %, хоч і не

достовірно, тоді як, значення ІСНЛ зростав на 30% ($p < 0,05$) відносно інтактних щурів. На підставі такого зменшення ІСНЛ, можливий розвиток стадії тривоги, за якої відбувається активація організму у щурів за впливу ВІКС.

Лейкоцитарний індекс (ЛІ), котрий враховує співвідношення різних форм лейкоцитів та характеризує їх відповідь на подразник, при використанні у до стресовий період ПАО КДГП "Гумілід" у щурів 3 групи зростав на 37% ($p < 0,05$) у порівнянні з тваринами 2 групи та достовірно не відрізнявся від значень у інтактних тварин. На наступний день після дії ВІКС, у щурів 3 групи співвідношення процентної кількості нейтрофілів до моноцитів достовірно було вищим на 80% ($p < 0,05$) у порівнянні з цим значенням у тварин 1 групи.

На наступний день після дії ВІКС, у тварин 3 групи, які отримували додатково до раціону КДГП "Еко-Імпульс Animal" співвідношення процентного числа нейтрофілів до лімфоцитів достовірно було вищим на

40 % ($p < 0,01$), при цьому індекс резистентності (ІР) у цих тварин, навпаки, був достовірно нижчим на 32% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з інтактними тваринами. Ступінь співвідношення компонентів фагоцитарної системи (ІСНМ) у тварин 3 групи був достовірно вищим у 2,2 рази ($p < 0,05$) від значень у тварин контрольної групи, що вказує на можливу активацію макрофагальної системи за дії ВІКС.

У тварин які у до стресовий період отримували вітамін Е (група 5) ІСНМ зростав на 88% ($p < 0,05$) у порівнянні з інтактними тваринами, тоді як інші співвідношення клітин лейкоцитарного ряду не відрізнялись достовірно. Можливо, такі особливості співвідношення окремих форм лейкоцитів слід пов'язувати із достатньою тривалістю дії помірних за своєю силою та різних за генезом стресорів на організм щурів та початком формування стадії резистентності.

Таблиця 2. Лейкоцитарні індекси крові щурів та використання кормових добавок гумінової природи та вітаміну Е за впливу стресу ($M \pm m$, $n=6$)

Лейкоцитарні індекси, у.о.	Група №				
	Лейкоцитарні індекси, у.о.				
	1 (інтактні)	2 (ВІКС)	3 (Гумілід+ВІКС)	4 (Еко Імпульс+ ВІКС)	5 (Вітамін Е+ВІКС)
ЛІ	0,397 $\pm$ 0,034	0,303 $\pm$ 0,028	0,456 $\pm$ 0,092 #	0,418 $\pm$ 0,037	0,373 $\pm$ 0,048
ІСНЛ	0,66 $\pm$ 0,066	0,855 $\pm$ 0,043 *	0,996 $\pm$ 0,163	0,922 $\pm$ 0,025 ***	0,743 $\pm$ 0,059
ІР	1,70 $\pm$ 0,179	1,29 $\pm$ 0,067	1,367 $\pm$ 0,308	1,165 $\pm$ 0,032 *	1,49 $\pm$ 0,149
ІНЗ	0,051 $\pm$ 0,009	0,091 $\pm$ 0,010 **	0,082 $\pm$ 0,020	0,70 $\pm$ 0,009	0,056 $\pm$ 0,011
ІСНМ	16,53 $\pm$ 1,718	25,43 $\pm$ 5,009	29,90 $\pm$ 5,354 *	35,67 $\pm$ 5,735 *	31,13 $\pm$ 5,169 *
ІСЛМ	27,43 $\pm$ 1,571	40,03 $\pm$ 7,046	34,40 $\pm$ 5,277	22,82 $\pm$ 1,866	23,18 $\pm$ 1,867

Примітка.: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p < 0,05$; ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p < 0,01$; *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p < 0,001$; # – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p < 0,05$; ## – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p < 0,01$; ### – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p < 0,001$; ° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p < 0,05$; °° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p < 0,01$; °°° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p < 0,001$.

Отже, за впливу ВІКС було зареєстровано достовірне зростання загальної кількості лейкоцитів у крові щурів та перерозподіл різних їх форм у лейкоцитарній формулі. Зміна лейкоцитарних індексів вказує на функціональні зміни в організмі та наявність нейтрофільного зсуву на тлі ВІКС у щурів. Також, на підставі розвитку лімфоцитопенії та зростання ІСНЛ у тварин, яких утримували за стандартних умов, після чого моделювали комбінований стрес, можна говорити про розвиток стадії тривоги організму за впливу стресу (за Сельє), це призводить до виходу в кров'яне русло більш молодих форм нейтрофілів, збільшенню як процентної частки еозинофілів, так і кількісної. За превентивного використання кормових добавок гумінової природи "Гумілід" та "Еко-Імпульс Animal" та вітаміну Е досліджувані показники наближаються до значень контрольної групи. Зміни співвідношення різних форм лейкоцитів за дії кормових добавок гумінової природи характеризують розвиток резистентності до дії стрес-факторів. Характер впливу на клітини лейкоцитарного ряду при використанні ПАО КДГП "Гумілід" мав схожий напрям змін, що і вітамін Е.

Висновки

1. Встановили, що за впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу достовірно зростає кількість лейкоцитів на 75%. Таке зростання викликає перерозподіл клітин лейкоцитарного ряду, а саме зростання відсотку еозинофілів та паличкоядерних нейтрофілів у 1,5 рази та у 2 рази відповідно. Аналіз за лейкоци-

тарними індексами у щурів після дії ВІКС виявив зростання ІСНЛ та ІНЗ.

2. Використання у достресовий період ПАО КДГП "Гумілід" викликає зменшення кількості лейкоцитів на 41% у порівнянні зі значеннями у тварин, які в цей період отримували очищену воду та не відрізнялась від значень у інтактних тварин. Процент еозинофілів та сегментноядерних нейтрофілів у цих щурів зростав на 80 % та на 67 % відносно інтактних тварин. Абсолютні значення еозинофілів, паличкоядерних та сегментноядерних нейтрофілів були достовірно нижчими у 58%, на 52% та на 37% відповідно у порівнянні з тваринами 2 групи.

3. У щурів, які отримували кормову добавку "Еко-Імпульс Animal" загальна кількість лейкоцитів зменшилась на 60% у порівнянні зі значеннями у тварин 2 групи, та на 30 % ($p < 0,05$) відрізнялась від значень у інтактних тварин. Кількість сегментноядерних нейтрофілів у цих тварин підвищилась на 22%, процент еозинофілів, сегментноядерних та паличкоядерних нейтрофілів був вищим на 80 %, на 20 % та на 67 % відповідно відносно інтактних тварин. Також, було зареєстровано зменшення абсолютного значення лімфоцитів на 40 % у порівнянні з інтактними тваринами та на 61% у порівнянні з результатами у тварин 2 групи.

4. Додаткове включення до раціону у достресовий період вітаміну Е викликало зменшення кількості лейкоцитів на 43%, кількісні значення різних форм лейкоцитів достовірно зменшувались, а саме еозинофіли на 65%,

паличкоядерні та сегментноядерні нейтрофіли на 64% та на 45% відповідно, лімфоцити на 37%, а моноцити на 53% відповідно у порівнянні з тваринами які в цей період отримували воду.

Список використаних джерел:

- Акімова В. М. Адаптаційні реакції та інтегральні гематологічні індекси неспецифічної резистентності при гострих та хронічних запальних процесах в черевній порожнині / В.М. Акімова, Л.Є. Лаповець // Вісн. проблем біології і медицини, 2015. – №1(3). – С. 79–82.
- Бучко О. М. Імунологічні та гематологічні показники крові свиней за дії гумінової домішки та аскорбінової кислоти / О. М. Бучко // Young Scientist., 2005. – № 2(17). – С. 25–28.
- Белай И. М. Исследование гипопиридеических и антиоксидантных свойств пикамилон и карнитина хлорида / И.М. Белай, В.В. Дунаев, В.С. Тишкин // Укр. ревматологический ж., 2001. – №1(3) – С. 21–25.
- Адаптационные реакции и уровни реактивности как эффективные диагностические показатели дозозологических состояний / Л.Х. Гаркави, Г.Н. Толмачев, Н.Ю. Михайлов и др. // Вест. Южного научного центра, 2007. – Т. 3. – №1. – С. 61–66.
- Грибан В. Г. Щодо ефективності використання гумінових препаратів у скотарстві та механізмі їх дії на організм / В.Г. Грибан, В.Г. Єфімов, В.М. Ракитянський та ін. // Наук. вісн. ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького, 2015. – Т. 17, № 3 (63).
- Дяченко Л.М. Зміни морфофункціональних показників крові шурів на тлі застосування кормових домішок гумінової природи та за дії стрес-факторів / Л.М. Дяченко, Л.М. Степченко // Проблеми регуляції фізіологічних функцій, 2018. №1(25). – С. 50–54.
- Дяченко Л. М. Стан еритроцитарної системи у крові шурів на тлі застосування кормових домішок гумінової природи та впливу комбінованого стресу / Л.М. Дяченко, Л.М. Степченко // Theoretical and Applied Veterinary Medicine, 2018. – Т. 6. – № 3. – Р. 34–38. doi: 10.32819/2018.63007.
- Єфімов В. Г. Вплив гумінових речовин на мінеральний обмін у корів / В.Г. Єфімов, В.М. Ракитянський // Наук.-техн. бюл. НДЦ біобезпеки та екол. контролю ресурсів АПК, 2012. – Т. 1, № 1. – С. 66.
- Єфімов В.Г. Вплив подавання обробленого торфу як домішки на показники клітинного імунітету, антиоксидантного статусу та продуктивності поросят у ранньому після відлучення періоді / В.Г. Єфімов, К.М. Костішкєвич, В.М. Ракитянський // Humanand Veterinary Medicine, 2016. – № 8(3). – С. 133–136.
- Михайленко Є.О. Протеїновий та амінокислотний обмін у м'язах курчат-бройлерів кросу КОББ 500 на тлі застосування кормової домішки "Гумілід" / Є.О. Михайленко, О.О. Дьомшина, Л.М. Степченко // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту ветеринарної медицини та біотехнології імені С.З. Гжицького, 2017. – Т. 19. – №77–С. 110.
- Stepchenko L.M. Condition of erythrocyte antioxidant laying hens for the actions of humic substances // L.M. Stepchenko, M.V. Skorik / Technical bulletin Scientific Institute of Animal Biology and State research control institute of veterinary preparations and feed additives, 2006. –Vol. 7, № 3, 4. –P. 137–43.
- Stepchenko L.M. Biologically active substances humic nature as regulators of homeostasis of poultry // L.M. Stepchenko // Collection of conference materials. "Radostim 2011". –Minsk, 2011. –С. 164–66.
- Weiner H. Use of animal models in peptic ulcer disease / H. Weiner // Psychosom Med., 1996. –Vol. 58, № 6. –P. 524–45.

Л. Дяченко асп., Л. Степченко канд. биол. наук

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, Днепро, Украина

References (Scopus):

- Akimova VM., Lapovets LE. Adaptive reactions and integral hematological indices of nonspecific resistance in acute and chronic inflammatory processes in the abdominal cavity. Bulletin of Biology and Medicine Issues – 2015. – 3 (1). – P. 79-82.
- Buchko OM. Immunological and hematological parameters of blood of pigs for action of humic additive and ascorbic acid. Young Scientist.2005; 2 (17):25-28.
- Belay IM, Tishkin VS. Investigation of hypolipidemic and antioxidant properties of picamilon and carnitine chloride. Ukrainian Rheumatological Journal. 2001;1 (3):21-25.
- Garkavy L.H., Tolmachev GN, Mikhailov N.Yu., et al. . Adaptation reactions and levels of reactivity as effective diagnostic indices of prenosological states. Bulletin of the Southern Scientific Center. – 2007. – 3(1). – С. 61-66.
- Griban VG, Efimov VG, Rakyatinsky VM et al. On the Effectiveness of the Use of Humene Preparations in Animal Husbandry and the mechanism of their effect on the organism. Scientific Bulletin of LNUVMBT named after SZ Gzhitsky. 2015; 17(3):63
- Diachenko LM., Stepchenko LM.Changes of morpho-functional indicators in blood of rats after the influence of feed additives of humic natural and for actions of stress factors. Problems of physiologic functions regulation. – 2018. – 1(25) – С. 50-54.
- DiachenkoLM., StepchenkoLM. Erythrocyte system of rat blood during the application of fodder additives of humic nature for combined stress. Theoretical and Applied Veterinary Medicine. – 2018. – Т.6. – №3. – С. 34-38. doi: 10.32819/2018.63007
- Efimov VG, Rakyatinsky VM. Influence of humic substances on mineral exchange in cows. Scientific and technical bulletin of NDC of biosafety and ecology. control of the resources of the agroindustrial complex. 2012; 1 (1):66
- Efimov VG, Kostyshkevich KM, Rakyatinsky VM. Influence of supply of treated peat as additive on cellular immunity, antioxidant status and piglet productivity in early postpartum period. Human and Veterinary Medicine. 2016; 8 (3):133-136.
- Mikhailenko EO, Domshina OO, Stepchenko LM. Protein and amino acid exchange in the muscles of broiler chickens COBB 500 cross with the use of the feed supplement "Gumilid". Scientific Bulletin of the Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named after SZ Gzhitsky. 2017; 19(77):110. doi.org/10.15421/nlvvet7725
- Stepchenko LM, Skorik. MV. Condition of erythrocyte antioxidant laying hens for the actions of humic substances. Technical bulletin Scientific Institute of Animal Biology and the State Research Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives. 2006; 7(3.4.):137-143.
- Stepchenko L.M. [Biologically active substances humic nature as regulators of homeostasis of poultry] // L.M. Stepchenko/ Collection of conference materials. "Radostim 2011". Minsk, – 2011. – С. 164-166.
- Weiner H. [Use of animal models in peptic ulcer disease] / H. Weiner // PsychosomMed. – 1996. – Vol. 58, № 6. – P. 524 – 545.

Надійшла до редколегії 28.01.2019

Отримано виправлений варіант 01.03.2019

Підписано до друку 01.03.2019

Received in the editorial 28.01.2019

Received a revised version on 01.03.2019

Signed in the press on 01.03.2019

ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ ЗА ЛЕЙКОЦИТАРНЫМИ ИНДЕКСАМИ У КРЫС ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО СТРЕССА

В ответ на действие стресс-факторов различного происхождения в живом организме запускается каскад адаптационных реакций, которые могут нивелировать функциональные нарушения гомеостаза. Комбинирование воздействия различных стресс-факторов может вызвать избыточное образование и накопление активных форм кислорода, что влечет за собой целый ряд патологических состояний, которые создают предпосылки для развития большого количества заболеваний. Одним из показателей развития адаптации и интегральным показателем состояния организма считается система крови, особенно, лейкоцитарная формула, перераспределение которой позволяет проанализировать характер влияния и оценить интенсивность адаптивных процессов в организме за счет функций, которые выполняют различные формы лейкоцитов. Лейкоцитарные индексы в которых использовали параметры лейкоцитарной формулы, позволяют оценить степень эндогенной интоксикации, развития резистентности и характер клеточного иммунитета при воздействии стресс-факторов на организм животных и человека. В статье рассмотрена возможность оценки превентивного использования натуральных антиоксидантов гуминовой природы за лейкоцитарными индексами на организм крыс на фоне водно-иммобилизационного комбинированного стресса (ВИКС). Для этого животных разделили на пять групп по 6 животных: 1- группа интактные животные (контроль); 2-5 – исследовательские группы. Животные всех исследовательских групп дополнительно получали перорально, индивидуально с помощью зонда в течение 18 суток воду, кормовые добавки "Гумилид" (в расчете 5 мг / кг массы тела по действующему веществу), "Эко-Импульс Animal" (из расчета 2,5 мг / кг массы тела) и витамин Е (в расчете 50 мг / кг массы тела). После чего, у животных 2, 3, 4 и 5 групп моделировали стресс. Установлено, что за действия водно-иммобилизационного комбинированного стресса к крови крыс происходит рост клеток лейкоцитарного ряда, главным образом за счет увеличения эозинофилов и палочкоядерных нейтрофилов. Использование в дострессовый период естественного антиоксиданта, кормовой добавки "Гумилид" вызывает уменьшение количества лейкоцитов на 41% по сравнению со значениями у животных, в этот период получали очищенную воды и не отличалась от значения у интактных животных. Изменение лейкоцитарных индексов указывает на функциональные изменения в организме и наличие нейтрофильного сдвига на фоне ВИКС у крыс. Также, действие ВИКС приводит к выходу в кровяное русло более молодых форм нейтрофилов, увеличению как процентной доли эозинофилов, так и количественной. По превентивного использования кормовых добавок гуминовой природы "Гумилид" и "Эко-Импульс Animal" и витамина Е исследуемые показатели приближаются к значениям контрольной группы.

Ключевые слова: лейкоциты, "Гумилид", "Эко-импульс animal", стресс.

L. Diachenko Ph.D stud., L. Stepchenko Ph.D.
Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

EVALUATION OF THE USE OF FEED ADDITIVES OF HUMIC NATURE BY INDICES OF LEUKOCYTES IN RATS AFTER COMBINED STRESS

In response to the action of stress factors of different genesis in a living organism, a cascade of adaptive responses, which can neutralize functional disorders of homeostasis, is triggered. Combining the effects of various stress factors can cause excessive formation and accumulation of active forms of oxygen, which entails a number of pathological conditions that create the preconditions for the development of a large number of diseases. One of the indicators of the development of adaptation and the integral indicator of the body's state is the blood system, especially the leukocytic formula, whose redistribution makes it possible to analyze the nature of the effect and estimate the intensity of adaptive processes in the body due to functions that perform different forms of leukocytes. Leukocyte indices in which the parameters of the leukocyte formula were used, allow assessment of the degree of endogenous intoxication, the development of resistance and the character of cellular immunity for the influence of stress factors on the organism of animals and humans. The article considers the possibility of evaluating the preventive effect of natural antioxidants of humic nature on indices of leukocytes on the organism of rats after the influence of combined water-immobilization stress (WICS). For this, the animals were divided into five groups of 6 animals: 1- group of intact animals (control); 2-5 – experimental groups. Animals of all experimental groups were additionally received orally, individually with the help of a probe for 18 days, water, feed additives "Humilid" (at 5 mg / kg of body weight per active ingredient), "Eco-Impulse Animal" (at a rate of 2.5 mg / kg body weight) and vitamin E (at a rate of 50 mg / kg body weight). In animals, 2, 3, 4 and 5 groups simulated stress. It has been established that the effects of water-immobilization combined stress on blood of rats lead to the growth of cells of the leukocyte series, mainly due to the increase of eosinophils and rod-neutrophils. The use of natural antioxidant, a feed additive "Humilid" in the pre-season period causes a decrease in the number of leukocytes by 41% compared to values in animals that received purified water during this period and did not differ from those in intact animals. The change in leukocyte indexes indicates functional changes in the body and the presence of a neutrophilic shear on the background of WICS in rats. Also, the effect of WICS leads to the release of the younger forms of neutrophils in the bloodstream, an increase in both the percentage of eosinophils and the quantitative. For preventive use of feed additives of humic nature, "Humilid" and "Eco-Impulse Animal" and vitamin E, the studied parameters are close to the values of the control group.

Key words: leukocytes, "Humilid", "Eco-Impulse Animal", stress.

УДК 577.122.8

Д. Креницька, студ., А. Юрченко, асп., О. Савчук, д-р біол.наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Н. Ліпець, студ.
ТОВ "Фармацевтичний завод "Біофарма", Київ, Україна

ЗМІНИ БІЛКОВОГО СКЛАДУ ТКАНИН ПРИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖИРІННЯ У ЩУРІВ

Проблема ожиріння в сучасному світі займає провідне місце поруч з іншими патологіями. Усупереч сталим уявленням про те, що причиною ожиріння є гіподинамія та надмірне надходження їжі, провідні медичні видання стверджують, що досліджувана патологія має поліморфне походження і пов'язана каскадом різних порушень в органах та їхніх системах. Останнім часом накопився масив даних, на основі яких постулюється участь тканинно-специфічних пептидних пулів у підтриманні гомеостазу, зокрема, встановлена їхня здатність регулювати процеси проліферації, диференціювання та загибелі клітин. Охарактеризовано фракції низько-, середньо- і високомолекулярних білків гомогенатів печінки, нирок, м'язів та жирової тканини при розвитку експериментального ожиріння у щурів. Білкові фракції були розділені за допомогою електрофорезу за методом Laemmli в 10 % ПААГ з використанням додецилсульфату натрію (ДДС-Na). Розподіл між білками у контрольній групі щурів з ожирінням показав різницю в кількості фракцій. Досліджено кількісний і якісний склад білкових фракцій у гомогенатах тканин щурів. В умовах експериментального ожиріння білковий склад тканин зазнав змін, а саме, збільшувався вміст середньомолекулярної фракції (67–35 кДа) і низькомолекулярної фракції (35–10 кДа). Експериментальні дані можуть свідчити про порушення білок-білкових взаємодій у цих органах і передбачити появу в кровотоці неспецифічних білків та їхніх фрагментів як результат посилення дії протеолітичних ферментів і руйнування клітин органів. Подальші дослідження особливостей змін білкового складу і пептидного пулу тканин щурів сприятимуть кращому розумінню біохімічних процесів за даної патології, що важливо при розробці нових підходів для діагностики та лікування ожиріння.

Ключові слова: ожиріння, білковий склад, висококалорійна дієта, диск-електрофорез, метаболічний синдром.

Вступ. Проблема ожиріння в сучасному світі займає провідне місце поруч з іншими патологіями. Усупереч сталим уявленням про те, що причиною ожиріння є гіподинамія та надмірне надходження їжі, провідні медичні видання стверджують, що досліджувана патологія має поліморфне походження та пов'язана каскадом різних порушень в органах та їхніх системах. Останнім часом накопився масив даних, на основі яких постулюється участь тканинно-специфічних пептидних пулів у підтриманні гомеостазу, зокрема, встановлена їх здатність регулювати процеси проліферації, диференціювання та загибелі клітин. Знання, отримані в результаті патофізіологічних аналізів захворювань людини, недостатні для того, щоб пояснити складні механізми їх патогенезу. Полігенні та багатофакторні розлади, такі як рак, захворювання серцево-судинної системи, ожиріння і діабет II типу, є прикладом захворювань, де моделі гризунів широко використовуються для дослідження фундаментальних механізмів шляхом відтворення деяких змін, які відбуваються в організмі людини [9]. Ожиріння змінює метаболічну і ендокринну функції жирової

тканини і призводить до підвищеного вивільнення жирних кислот, гормонів і прозапальних молекул, які сприяють ускладненню, пов'язаним з ожирінням [14]. Ці розлади включають гіпертензію, дисліпідемію і резистентність до глюкози. Це фактор ризику для серцево-судинних захворювань, інсульту, цукрового діабету 2 типу та деяких видів раку [12]. Збільшення рівня чутливих до запалення білків плазми (ISP) фібриногену, альфа-1-кислий глікопротеїн (AGP), альфа1-антитрипсину, гаптоглобіну і церулоплазміну пов'язані зі збільшенням ваги [7]. У різних дослідженнях сироватковий альбумін і концентрація загального білка під час ожиріння не відрізнялися від контрольних [1]. Навіть під час дослідження зразків пацієнтів з ожирінням показали помітно знижену концентрацію альбуміну в сироватці порівняно з контрольною групою пацієнтів [2]. Крім того, концентрації сироваткового альфа 1-кислого глікопротеїну, зв'язуючого білка гормону росту (GHBP), феритину і ретинол-зв'язуючого білка 4 (RBP4), збільшуються зі збільшенням ваги.