

УДК 616:636.1:611.018.5:615.03

DOI: 10.31073/vet_biotech41-05

КРИЦЯ Я.П., канд. вет. наук, доц., e-mail: iana.kritsyia@gmail.com,**ЗАХАРОВА О.М.**, канд. біол. наук, e-mail: olga_zm@ukr.net,**МОЛОЖАНОВА А.В.**, e-mail: vetereneri@ukr.net,**СИДОРЕНКО Т.В.**, e-mail: t-sudorenko@ukr.net*Інститут ветеринарної медицини НААН*

ВПЛИВ РІБОТАНУ ТА ЦИКЛОФЕРОНУ НА ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЛОШАТ

Аналіз вмісту В-лімфоцитів у крові лоша́т показав позитивний вплив імуномодуляторів (ріботану та циклоферону) на кількість В-клітин, але в більшій мірі вплив встановлено у тварин, яким вводили ріботан. Внаслідок застосування ріботану в крові лоша́т встановлено активацію В-ланки імунітету за підвищення кількості В-лімфоцитів на 0,9–1,7%, що свідчить про посилення рівня гуморального імунітету. Підвищення вмісту імунних комплексів великої молекулярної маси у крові лоша́т дослідних груп (особливо при застосуванні ріботану), ймовірно, свідчить про збільшення утворення антитіл під впливом імуномодуляторів, оскільки ЦК великої молекулярної маси утворюються в результаті їх надлишку і швидко виводяться з організму. Оцінюючи стан гуморального імунітету тварин дослідних груп, слід відзначити, що у крові лоша́т під впливом ріботану підвищувалася кількість В-лімфоцитів (клітинна активність В-ланки), а у крові лоша́т, яким застосовували циклоферон, функціональна активність (рівень ЦК) відповідно.

Ключові слова: імунітет, імуномодулятор, ріботан, циклоферон, В-лімфоцити, лоша́та.

Вступ. Імунний статус організму коней, а також його зміни в період раннього онтогенезу вивчені лише частково [1]. У той час, як деякі вроджені імунні реакції здаються повністю функціональними від народження, початок адаптивної імунної відповіді затримується. Від В-клітинної ланки імунної системи залежить стан і виразність формування активного імунітету в ранньому постнатальному періоді.

Оскільки В-лімфоцити є попередниками клітин, які продукують антитіла, то збільшення їх кількості в період становлення імунної системи є ознакою підвищення здатності організму до активного синтезу захисних антитіл [2–4].

Збільшення кількості В-клітин під впливом ріботану відзначають А.Ю. Ханіс [5], Н. Салига та О. Віщур [6].

Синтез власних антитіл починається лише з 2-тижневого віку, однак до одного місяця життя він відбувається на низькому рівні. Слабка гуморальна відповідь на антигенну стимуляцію в цей період пов'язана, з одного боку, з

наявністю в організмі молодих тварин материнських антитіл, які блокують антигени, що надходять, з іншого – з недостатнім формуванням В-системи імунітету, яка відповідає за синтез антитіл [6].

Ріботан є імуностимулятором широкого спектру дії, він стимулює первинну та вторинну імунні відповіді на різні антигени, підсилює міграцію стовбурних клітин, фагоцитарну активність макрофагів, кооперацію Т- і В-лімфоцитів, а також синтез антитіл [6].

Циклоферон є індуктором ендогенного інтерферону та володіє протівірусною, антипроліферативною, протипухлинною, протизапальною та імуномодулюючою активністю. Препарат індукує високі титри інтерферону в органах і тканинах, що містять лімфоїдні елементи. Імуномодулюючий ефект циклоферону виражається в активації фагоцитозу, природних кілерних клітин, цитотоксичних Т-лімфоцитів і корекції імуного статусу організму при імунодефіцитах різного походження [7].

Циклоферон індукує в організмі утворення раннього альфатипу інтерферону, сприяє підвищенню концентрації ендогенного інтерферону в сироватці крові. У подальшому активує синтез Т-лімфоцитів (CD3+, CD4+), а також функціональну спроможність фагоцитів, стимулює природну кілерну активність і, таким чином, обумовлює імуномодулюючий ефект [8].

Отже, дослідження показників клітинного імунітету лоша́т під впливом імуномодуляторів для корекції імуного статусу організму є актуальним.

Мета роботи полягала в дослідженні імунологічних показників крові лоша́т під впливом ріботану та циклоферону.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводилися на базі приватних конегосподарств Київської області у 2021 році.

Для проведення дослідів з лоша́т 14-добового віку за принципом аналогів формували контрольну та 2 дослідні групи (табл. 1).

Таблиця 1

Схема проведення досліджень

Група тварин	Кількість тварин	Назва препарату
Дослідна 1	10	Ріботан
Дослідна 2	10	Циклоферон
Контрольна	10	Ізотонічний розчин натрію хлориду

Імуномодулятори ріботан і циклоферон вводили внутрішньом'язово у наступних дозах: ріботан – 1 мл/тварину протягом трьох днів; циклоферон – 2 мл/тварину у вигляді 12,5% розчину на 1, 2, 4, 6, 8 добу. Тваринам

контрольної групи вводили ізотонічний розчин натрію хлориду. Відбір крові проводили у лошат місячного віку.

Визначали наступні показники імунітету: відносну кількість у крові загальних В-лімфоцитів (В-заг., %), абсолютну кількість В-лімфоцитів (В-заг., Г/л), концентрацію циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові (ЦК, од.), показник фагоцитозу (ПФ, %), фагоцитарне число (Фч, од.), метаболічну активність нейтрофілів крові (НСТ-тест, %), середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК, од.) [9].

Концентрацію ЦК у сироватці крові визначали за методом преципітації з 3,5% розчином поліетиленгліколю з відносною молекулярною масою 6000 (ПЕГ – тест ОП 280).

Фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові визначали постановкою реакції з тест-об'єктом, в якості якого застосовували стандартні частки латексу ($d = 1,0\text{--}1,03$ мкм) на підставі підрахунку 100 клітин. Показник фагоцитозу (ПФ) визначали як відсоткове відношення активних фагоцитів до їх загальної кількості. Фагоцитарно активною вважали клітину, яка поглинула одну й більше часток латексу.

Фагоцитарне число (Фч) визначали в тій же реакції як середнє число фагоцитованих часток латексу, що приходяться на один активний фагоцит.

Метаболічну активність нейтрофілів крові вивчали в тесті відновлення нітросинього тетразолію за методикою Park B. et al. у модифікації Бажори Ю.І. [9].

Отримані дані були оброблені методами варіаційної статистики з використанням Microsoft Excel. Усі обчислення проводились на рівні вірогідності $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$, прийнятої для більшості біологічних досліджень [9].

Результати досліджень та їх обговорення. Стан *гуморального імунітету* крові лошат під впливом ріботану та циклоферону визначали за кількістю В-лімфоцитів (рис. 1) та за рівнем утворення ЦК (табл. 2).

Аналізуючи отримані дані, слід відзначити тенденцію до збільшення кількості В-лімфоцитів у крові лошат першої та другої дослідних груп, порівняно з тваринами контрольної групи. Зокрема, у крові лошат чистокровної верхової породи першої дослідної групи встановлено вищий на 1,7% (8,0%) і української верхової – на 0,9% (4,1%) вміст В-лімфоцитів, ніж у контрольної групи тварин. У крові лошат другої дослідної групи, яким вводили циклоферон, встановлено збільшення вмісту В-лімфоцитів: чистокровної верхової породи – на 1,2% (5,6%), української верхової породи – лише на 0,3% (1,4%), порівняно з тваринами контрольної групи.

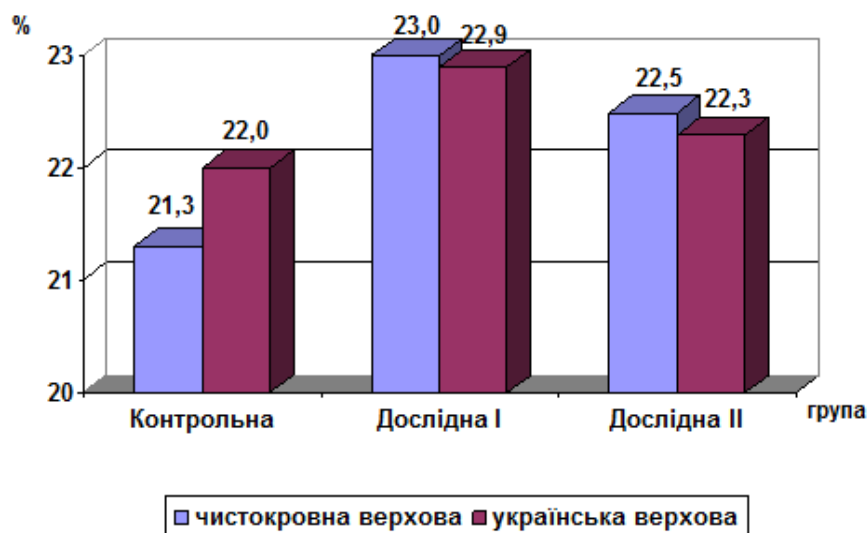


Рис. 1. Відносна кількість В-загальних лімфоцитів у крові лошат.

Отже, під впливом ріботану і циклоферону відзначено збільшення вмісту В-лімфоцитів у крові лошат, але більша їх кількість виявилася у крові тварин, яким вводили ріботан, тобто у тварин першої дослідної групи.

Таблиця 2

Рівень і розмір ЦК у крові лошат, $M \pm m$, $n=30$

ЦК, од.	Група				
	контрольна (n=5/5)	дослідна I (n=4/6)	P ₁	дослідна II (n=6/4)	P ₂
Великі	<u>3,8±0,9</u>	<u>6,0±0,5</u>	<u>≥0,05</u>	<u>8,5±1,6</u>	<u><0,05</u>
	4,2±1,2	6,0±0,6	>0,05	9,0±3,7	>0,05
Середні	<u>9,0±2,5</u>	<u>11,0±3,5</u>	<u>≥0,05</u>	<u>13,5±3,4</u>	<u>≥0,05</u>
	6,4±1,2	12,0±1,5	<0,05	11,3±4,0	>0,05
Дрібні	<u>16,3±3,4</u>	<u>16,0±4,5</u>	<u>≥0,05</u>	<u>20,8±5,1</u>	<u>≥0,05</u>
	12,2±1,0	21,0±2,6	<0,05	18,5±5,2	>0,05

Примітки: P₁ – вірогідність між контрольною та I дослідною групами;
P₂ – вірогідність між контрольною та II дослідною групами;
у чисельнику – чистокровна верхова, у знаменнику – українська верхова порода.

Дані таблиці 2 свідчать, що найвищий рівень ЦК встановлений у крові тварин першої та другої дослідних груп. Зокрема, у тварин чистокровної верхової породи, яким вводили циклоферон (друга дослідна група), виявлено збільшення великих імунних комплексів у 2,2 рази (P<0,05) та української верхової породи – у 2,1 рази, порівняно з лошатами контрольної групи.

У крові тварин першої дослідної групи, яким застосовували ріботан, встановлено тенденцію до збільшення ЦК великої молекулярної маси: чистокровної верхової породи – у 1,6 рази, української верхової – у 1,4 рази.

Утворення ЦІК середньої та низької молекулярної маси стимулюють в однаковій мірі як риботан, так і циклоферон. Щодо розміру імунних комплексів, то найбільша різниця встановлена між великими ЦІК, рівень яких у крові лоша́т першої дослідної групи вищий в 1,4–1,6 разів, другої дослідної групи – у 2,1–2,2 рази ($P < 0,05$), порівняно з тваринами контрольної групи. Вміст ЦІК середньої молекулярної маси вищий в 1,2–1,9 рази ($P < 0,05$) у крові тварин першої дослідної і у 1,5–1,8 рази – другої дослідної групи, порівняно з контролем. Різниця щодо вмісту ЦІК низької молекулярної маси у крові тварин контрольної і дослідних груп склала всього у межах 1,7 раз ($P < 0,05$).

Отже, підвищення ЦІК високої молекулярної маси у крові лоша́т дослідних груп (особливо першої), ймовірно, свідчить про збільшення кількості антитіл під впливом імуномодуляторів, оскільки ЦІК високої молекулярної маси утворюються в результаті їх надлишку і швидко виводяться з організму.

Оцінюючи стан гуморального імунітету тварин дослідних груп, слід відзначити, що у крові лоша́т першої дослідної групи підвищувалася клітинна активність В-ланки (кількість В-лімфоцитів), а у крові лоша́т другої дослідної групи – функціональна ланка (рівень ЦІК).

Фагоцитоз оцінювали за його показником і фагоцитарним числом (табл. 3) та за ступінню поглинання нітросинього тетразолію (табл. 4).

Аналізуючи показник фагоцитозу крові лоша́т дослідних груп, слід відзначити вірогідне збільшення кількості фагоцитуючих нейтрофілів у тварин першої дослідної групи: чистокровної верхової породи на 10% (16,7%; $P < 0,05$) та української верхової породи – на 1,9% (3,1%; $P > 0,05$), порівняно з тваринами контрольної групи. У крові коней чистокровної верхової породи (друга дослідна група) також встановлено тенденцію до збільшення показника фагоцитозу на 3,3% (5,5%), порівняно з контрольними тваринами.

Таблиця 3

**Показник фагоцитозу (ПФ) та фагоцитарне число (Фч) крові лоша́т,
M±m, n=30**

Показник	Група		
	контрольна (n=5/5)	дослідна I (n=4/6)	дослідна II (n=6/4)
ПФ, %	<u>60,0±2,5</u>	<u>70,0±2,0*</u>	<u>63,3±2,1</u>
	60,0±1,2	61,9±1,3	60,0±1,3
Фч, од.	<u>3,5±0,7</u>	<u>2,5±0,5</u>	<u>3,3±0,4</u>
	4,0±0,7	3,8±0,4	4,3±0,3

Примітки: у чисельнику – чистокровна верхова, у знаменнику – українська верхова; n – кількість тварин кожної породи; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою тварин.

Значення показника Фч знаходили у крові лошат усіх дослідних груп у межах 2,5–4,3 од., які не мали вірогідних відхилень відносно контрольного рівня.

Отже, на вміст фагоцитуючих нейтрофілів у крові лошат більший вплив мав риботан і менший – циклоферон; на фагоцитарне число вірогідного впливу препаратів не встановлено, але слід зазначити зменшення цього показника у крові лошат першої дослідної групи.

Таблиця 4

Загальна окиснювально-відновлювальна активність нейтрофілів крові лошат дослідних груп в НСТ-тесті, $M \pm m$, $n=30$

Нейтрофіли, %	Група		
	контрольна (n=5/5)	дослідна I (n=4/6)	дослідна II (n=6/4)
+	$5,5 \pm 0,7$	$5,5 \pm 1,5$	$9,2 \pm 1,6$
	$6,4 \pm 1,2$	$4,8 \pm 0,6$	$6,3 \pm 2,7$
++	$5,5 \pm 0,8$	$4,0 \pm 2,0$	$5,2 \pm 0,5$
	$3,8 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,6$
+++	$3,0 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,5$
	$2,4 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,3$

Отже, отримані дані НСТ-тесту встановлюють загальну кількість нейтрофілів, позитивно реагуючих з НСТ та середній цитохімічний коефіцієнт для однієї клітини (рис. 2, 3).

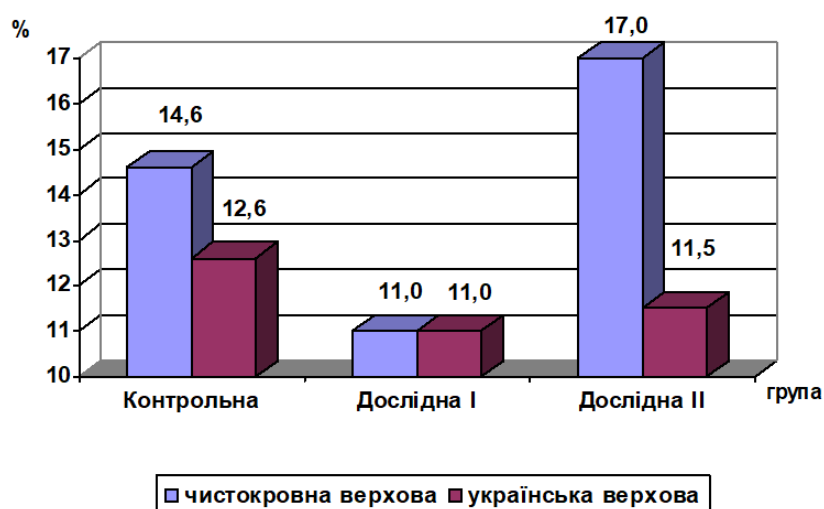


Рис. 2. Відносна кількість нейтрофілів крові лошат дослідних груп, позитивно реагуючих з НСТ.

Дані рис. 2 свідчать, що загальний вміст позитивно реагуючих з НСТ нейтрофілів є найнижчим у крові лошат першої дослідної групи. Зокрема, у крові тварин, яким вводили ріботан, встановлена тенденція до зменшення загальної кількості НСТ-позитивних нейтрофілів: у чистокровної верхової на 3,6% (24,7%) та української верхової породи – на 1,6% (12,7%), що, можливо, зв'язано з більшою кількістю Т- і В-лімфоцитів у крові тварин цієї групи.

При аналізі СЦК крові лошат дослідних груп виявлена приблизно така ж тенденція, що і в кількості нейтрофілів, позитивно реагуючих з НСТ.

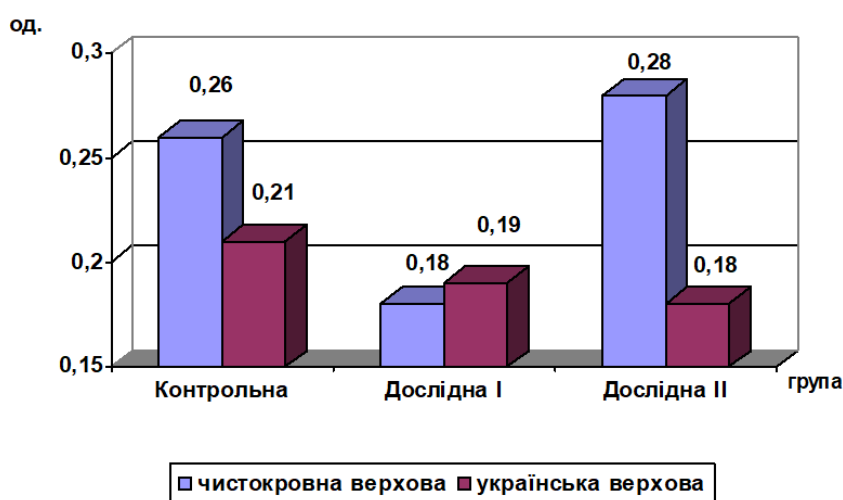


Рис. 3. Середній цитохімічний коефіцієнт крові лошат дослідних груп.

Отже, слід відзначити зниження окиснювально-відновлювальної активності нейтрофілів крові лошат першої дослідної групи, що відбувається за рахунок розвитку Т- і В-систем імунітету. Стан фагоцитозу у даному випадку має менше значення в імунній системі; більшого розвитку набуває клітинна і гуморальна ланки імунітету, власне на які і впливає ріботан.

Достатній розвиток Т- і, особливо, В-ланок імунної системи у цьому віці є дуже важливим, тому що в цей період в організмі лошат відбувається утворення достатньої кількості антитіл для забезпечення нормальної імунної відповіді на вакцинацію, яка була проведена у двотижневому віці. Достатня імунна відповідь є запорукою нормального росту і розвитку організму, зниження захворюваності молодняку, а також підвищення його життєздатності та робочих якостей.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. При дослідженні показників гуморального імунітету лошат після застосування ріботану встановлено підвищення клітинної активності В-ланки імунітету (збільшення кількості В-лімфоцитів на 0,9–1,7%).

2. В крові лоша́т за дії циклоферона відзначено підвищення функціональної активності В-ланки імунітету (збільшення рівня ЦІК з великою молекулярною масою у 2 рази; $P < 0,05$).

В подальших дослідженнях вважаємо необхідним провести дослідження клітинної ланки імунітету лоша́т під впливом циклоферону.

EFFECT OF RIBOTAN AND CYCLOFERON ON THE IMMUNOLOGICAL BLOOD PARAMETERS IN FOALS / Krytsia Y.P., Zakharova O.M., Molozhanova A.V., Sydorenko T.V.

Introduction. *It is necessary to maintain a body at sufficient physiological level for the effective functioning of the immune system, which determines the resistance and immune reactivity of animals. The foal's immune response and the available immune mechanisms along with changes over the first months of life until the immune system becomes adult-like are only partially understood. The development of equine immunity from the fetus to adulthood is complex. While several innate immune responses seem to be fully functional from birth, the onset of adaptive immune response is delayed.*

The goal of the work was to study the blood parameters of foals under the influence of some immunomodulators.

Materials and methods. *14-day-old foals ($n=30$) were used for the study. Animals in the experimental group 1 were administered the immunomodulator ribotan intramuscularly in the middle third of the neck once a day at a dose of $1 \text{ cm}^3/\text{animal}$ for three days. Animals in the experimental group 2 were administered the immunomodulator cycloferon intramuscularly in the middle third of the neck once a day at a dose of $2 \text{ cm}^3/\text{animal}$ for 1, 2, 4, 6, 8 days. Blood sampling was performed in 1-month old foals.*

Results of research and discussion. *An analysis of the content of B-cells in the blood of foals showed a positive effect of both immunomodulators on the number of B-cells, but the effect was higher in animals that were injected with ribotan.*

As a result of the use of ribotan, in the blood of foals an increase in the cellular activity of the B-system of immunity was found (the number of B-cells was higher by 0.9-1.7%), which indicates an increase in the level of humoral immunity.

An increase in the content of large immune complexes in the foals of the experimental groups (especially with the use of ribotan) probably indicates an increase in the amount of antibodies under the influence of immunomodulators, since large CIC are formed as a result of their excess and are quickly excreted from the body.

Assessing the state of humoral immunity of the foals of the experimental groups in general, it should be noted that in the blood of animals under the influence of ribotan, the cellular activity of the B-system (the number of B-cells) increased, and in the blood of the foals who were treated with cycloferon, the functional activity increased (CIC level).

Conclusions and prospects for further research. *Thus, an increase in the cellular activity of the B-immune system (the number of B-cells was higher in 0.9-1.7%) was established for the extension of the humoral immunity after the administration of the ribotan. In the blood of foals under the infusion of cycloferon, an increase in the functional activity of the B-immune system was noted (an increase in the level of great CIC in 2 times).*

Keywords: *immunity, immunomodulator, ribotan, cycloferon, B-cells, foals.*

REFERENCES

1. Baakhtari, M., Imaizumi, N., Kida, T. [et al.] (2022). Effects of branched-chain amino acids on immune status of young racing horses. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84(4), 558-565. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0529>.
2. Wilson, A., Pinchbeck, G., Dean, R., & McGowan C. (2021). Equine influenza vaccination in the UK: Current practices may leave horses with suboptimal immunity. *Equine Veterinary Journal*, 53(5), 1004-1014. <https://doi.org/10.1111/evj.13377>
3. Raza, F., Babasyan, S., Larson, E. M. [et al.] (2021). Peripheral blood basophils are the main source for early interleukin-4 secretion upon in vitro stimulation with Culicoides allergen in allergic horses. *PLoS One*, 16(5), e0252243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252243>.
4. Perkins, G.A., & Wagner, B. (2014). The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Veterinary Journal*, 18. <https://doi.org/10.1111/evj.12387>.
5. Khanis, A.Y. (2010). Efektyvnist imunomodulatoriv ta adiuvanta pry imunyzatsii krolykiv proty mikrosporii [Efficiency of immunomodulators and adjuvant in immunization of rabbits against microsporia]. *Veterynariia – Veterinary*, 1, 21-23 [in Russian].
6. Salyha, N., & Vishchur, O. (2020). Formuvannia klitynnoho imunitetu porosiat pid vplyvom imunomodulatora tymalinu [Formation of cellular immunity of piglets under the influence of the immunomodulator thymalin]. *Visnyk Lvivskoho universytetu – Bulletin of Lviv University*, 29, 165-170 [in Ukrainian].
7. Romantsev, M.G., Ershov, F.I., & Kovalenko, A.L. (1998). *Immunodefitsitnyie sostoyaniya: korrektsiya tsikloferonom [Immunodeficiency states: correction with cycloferon]*. SPb [in Russian].
8. Ershov, F.I., & Kiselyov, O.I. (2005). *Interferony i ih induktoryi (ot molekul do lekarstv) [Interferons and their inducers (from molecules to drugs)]*. M.: GEOTAR-Media [in Russian].
9. Katsy, H.D., & Koiuda, L.I. (2003). *Metody otsinky zakhysnykh system orhanizmu ssavtsiv [Methods for assessing the defense systems of the mammalian body]*. Luhansk: Elton-2 [in Russian].