

Wpływ dodatku prebiotyków na aktywność interleukiny 1 i zmiany w subpopulacjach leukocytów krwi cieląt

MONIKA SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA, DARIUSZ BEDNAREK, CEZARY KOWALSKI*

Zakład Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Zakład Farmakologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Szymańska-Czerwińska M., Bednarek D., Kowalski C.

Effect of prebiotic additives on interleukin 1 activity and alternations of peripheral blood leukocyte subpopulations in calves

Summary

The aim of the study was to examine the influence of prebiotics (mannan oligosachacharides and β -glukanes) on alternations in peripheral blood leukocytes and interleukin 1 (IL1) activity in calves. Calves in group I received feed supplemented by prebiotics. The second group of calves (group II) was the control group and received the same feed, but without prebiotics. The leukocyte subpopulations were determined by flow cytometry and the following parameters were assayed: the total number of leukocytes (WBC), general percentage of lymphocytes (LYM) and their subsets CD2⁺ (T lymphocytes), CD4⁺ (T helper lymphocytes), CD8⁺ (T suppressor/cytotoxic lymphocytes) and WC4⁺ (B lymphocytes) as well as neutrophils (PMNL) and mid-size leukocyte per cent (MID), i.e. total value of monocytes, eosinophils and basophils. Additionally, the interleukin 1 activity in serum of the calves was estimated during the study. The obtained results indicated that the percentage of some subsets of T lymphocytes, such as CD 2⁺ and CD 8⁺, and also WC4⁺, significantly increased in the peripheral blood of the calves. A similar effect was observed for interleukin 1 (IL1) activity in the serum of the studied calves. The remaining leukocyte parameters did not change significantly.

Keywords: β -glukans, mannan oligosacharides, leukocytes, interleukin 1

Powszechne stosowanie przez szereg ostatnich lat antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW) w hodowli zwierząt doprowadziło do zwiększenia ryzyka narastania lekooporności zarazków na antybiotyki oraz przenoszenia jej z patogenów zwierzęcych również na ludzkie. W związku z tym od 1 stycznia 2006 r. we wszystkich krajach UE wprowadzono bezwzględny zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu. Dla producentów zwierząt hodowlanych skutki tej decyzji mogą mieć jednak negatywny wpływ na wyniki produkcji (2, 5, 7, 11).

Zakaz stosowania ASW wymusił konieczność poszukiwania dla nich nowych alternatywnych zamienników, które m.in. poprzez stymulację naturalnych mechanizmów obronnych organizmu zmniejszyłyby jego podatność na choroby, a tym samym umożliwiły uzyskiwanie lepszych efektów produkcyjnych. W żywieniu zwierząt można stosować różne dodatki paszowe, które podobnie jak ASW wpływają korzystnie na mikroflorę przewodu pokarmowego, a także posiadają inne pozytywne właściwości (1, 3, 9). Jedną z alter-

natyw dla antybiotyków paszowych są tzw. prebiotyki (7).

Prebiotyki są dodatkami paszowymi nie zawierającymi, jak wcześniej stosowane probiotyki, żywych mikroorganizmów, zawierają natomiast substancje odżywcze stymulujące wzrost naturalnej mikroflory jelitowej przewodu pokarmowego zwierząt. Substancje te działają również ogólnie na organizm m.in. poprzez wpływ na jego układ odpornościowy. Do prebiotyków zaliczane są: fruktooligosacharydy, galaktooligosacharydy oraz mannooligosacharydy (6, 10). Coraz częściej stosowanym prebiotykiem w żywieniu zwierząt jest wyciąg ze ścian komórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Wyselekcjonowane i wstandaryzowane frakcje ścian komórkowych tych drożdży są bogatym źródłem naturalnych wielocukrów, tzw. β -glukanów oraz mannooligosacharydów (MOS), które posiadają silne właściwości stymulujące układ odpornościowy. Mannooligosacharydy wpływają ponadto korzystnie na mikroflorę przewodu pokarmowego, zapobiegając przyleganiu bakterii

patogennych do jego śluzówki. Wykazują zwłaszcza pozytywne działanie w walce z wysoce patogennymi drobnoustrojami z rodzaju *Salmonella*, a także bakteriami *Escherichia coli*, ograniczając istotnie możliwość zasiedlania przewodu pokarmowego przez te zarazki (3, 6, 8, 9). Jednym z ostatnio wprowadzonych do obrotu handlowych preparatów przeznaczonych dla zwierząt gospodarskich zawierającym MOS i β -glukany jest Alphamune (Alpharma). Preparat ten stosuje się u bydła i świń jako dodatek do pasz w dawce 0,5-1 kg/tonę. Zawiera on wystandaryzowane frakcje 1,3-1,6 β -glukanów oraz β -mannany, w pełni wykorzystywane zwłaszcza przez przeżuwacze.

W oparciu o dotychczas opublikowane dane (3, 6, 8, 9) oczekiwano, że prebiotyki mogą wpływać na naturalne mechanizmy obronne i odgrywać pewną rolę w utrzymaniu prawidłowego stanu zdrowotnego cieląt. Dlatego też podjęto niniejsze badania w celu określenia wpływu mieszanki prebiotyków – β -glukanów i mannanooligosacharydów na odporność komórkową i humoralną cieląt w odniesieniu do zmian w subpopulacjach obwodowych leukocytów krwi oraz aktywności IL-1.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 12 klinicznie zdrowych cielętach, rasy ncb w wieku 6-8 tygodni o średniej masie ciała około 75 kg. Cielęta te podzielono na dwie równe grupy. Grupę I stanowiły cielęta, które przez okres 7 tygodni otrzymywały paszę z dodatkiem preparatu Alphamune (Alpharma) w dawce 14 g na zwierzę dziennie. Grupę II (kontrolną) stanowiły cielęta żywione tą samą paszą bez dodatku prebiotyku.

Badania laboratoryjne wykonano we krwi pełnej i surowicy cieląt. Krew do badań pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej, przez okres 7 tygodni, do próbek zawierających antykoagulant (EDTA-K₂, 0,07 mmol/l ml krwi), dwukrotnie w ciągu tygodnia, zawsze w godzinach rannych przed karmieniem zwierząt.

We krwi pełnej oznaczano: ogólną liczbę leukocytów (WBC) z oceną jakościową poszczególnych ich subpopulacji z podziałem na limfocyty (LYM), granulocyty obojętnochłonne (PMNL) oraz komórki średniej wielkości tzw. MID (mid-size leukocytes). Ostatni z wymienionych parametrów, tj. wskaźnik MID stanowi sumaryczną wartość monocytów, bazofilów i eozynofiliów krwi w jednostce objętości. Badania te przeprowadzono przy użyciu analizatora hematologicznego AutoCounter AC 920 (Swelab Instrument AB, Sweden). W celu wykonania szczegółowej analizy fenotypowej limfocytów krwi obwodowej cieląt wykorzystano cytometr przepływowy Coulter Epics XL 4C (Beckman Coulter Company, USA) oraz panel przeciwciał monoklonalnych przeznaczonych do badania subpopulacji limfocytów T (CD2⁺), Th (CD4⁺), Ts/c (CD8⁺) i B (WC4⁺) skoniugowanych z FITC

(produkcji Serotec Ltd. Kidlington, Oxford, UK). Natomiast dla oceny aktywności interleukiny 1 (IL-1) w surowicy wykorzystano zestaw diagnostyczny ELISA (Quantikine[®], firmy R&D Systems) z własnymi modyfikacjami.

W przeprowadzonych badaniach oceniano dodatkowo średnią masę ciała zwierząt w poszczególnych grupach oraz ich tygodniowe przyrosty, a także stopień wykorzystania paszy (FCR) przez te zwierzęta.

Analiza statystyczna otrzymanych wyników przeprowadzona była w oparciu o średnie arytmetyczne (\bar{x}) i błąd standardowy średniej (SEM) badanych wskaźników, a różnice znamienne statystycznie między grupami zwierząt oceniono przy użyciu testu t-Studenta na poziomie istotności: $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,001$.

Wyniki i omówienie

Zmiany w obrazie białokrwinkowym u cieląt żywionych paszą z dodatkiem prebiotyków i zwierząt kontrolnych przedstawiono w tab. 1 i 2. Różnice w ogólnej liczbie leukocytów (WBC) we krwi obwodowej cieląt nie były istotne statystycznie między badanymi grupami zwierząt. Istotnych różnic nie zaobserwowano również w wartościach wskaźnika MID i odsetka PMNL.

W trakcie doświadczenia zaobserwowano natomiast różnice istotne statystycznie dotyczące ogólnego odsetka limfocytów we krwi obwodowej cieląt (tab. 1). Odsetek ten był istotnie wyższy u cieląt doświadczalnych w stosunku do kontrolnych ($p \leq 0,01$) w 42. dniu

Tab. 1. Wpływ paszy z dodatkiem prebiotyków na wskaźniki układu białokrwinkowego cieląt

Dzień badania	Parametr							
	WBC (10 ⁹ /l)		LYM (%)		PMNL (%)		MID (%)	
	I	II	I	II	I	II	I	II
0	9,30	8,83	70,00	80,67	24,00	17,67	6,00	5,00
2	10,93	12,95	67,33	76,67	25,33	19,33	7,33	4,00
7	11,53	12,33	61,00	66,33	31,67	26,00	7,33	5,67
9	11,47	12,17	65,33	68,67	26,00	25,00	8,67	6,33
14	9,60	12,65	62,00	67,00	29,67	26,33	8,33	6,67
16	9,03	11,00	63,67	64,33	26,00	25,00	7,67	8,00
21	8,80	12,10	64,67	59,00	27,67	32,00	7,67	9,00
23	8,63	11,50	67,33	64,33	24,67	28,33	8,00	7,33
28	8,37	10,07	64,00	59,00	29,00	33,67	7,00	7,33
30	8,43	9,43	68,67	61,67	23,33	29,67	8,00	8,67
35	9,50	8,83	67,67	68,00	23,67	23,00	8,67	9,00
37	9,07	9,77	70,00	61,33	27,33	30,67	5,67	8,00
42	8,57	10,93	68,67**	57,67	24,00	33,67	7,33	8,67
44	8,77	10,93	62,33	59,67	30,00	32,00	7,67	8,33
\bar{x}	9,42	11,49	65,90	65,31	26,59	27,31	7,52	7,28
SEM	0,72	2,11	2,92	5,16	2,43	4,28	0,80	1,02

Objaśnienia: ** – $p \leq 0,01$

Tab. 2. Wpływ paszy z dodatkiem prebiotyków na subpopulacje limfocytów krwi obwodowej oraz aktywność interleukiny 1 w surowicy cieląt

Dzień badania	Parametr									
	CD2 ⁺ (%)		CD4 ⁺ (%)		CD8 ⁺ (%)		WC4 ⁺ (%)		IL-1 (pg/ml)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	58,80	59,70	28,50	25,75	18,43	18,73	18,53	18,63	0,10	0,20
2	61,17	56,00	30,47	23,95	20,77	21,33	20,60	18,33	0,20	0,30
7	63,53	57,33	27,90	24,50	20,73	18,63	22,23	20,77	9,36*	0,20
9	64,47	60,47	27,20	22,55	20,77	18,23	21,20	20,13	8,10*	0,30
14	65,60	61,23	29,07	23,55	20,07	17,97	21,47	17,90	7,20*	0,40
16	65,73	60,20	30,20	29,07	21,37	17,83	23,13	19,30	7,18*	0,20
21	65,23	60,10	31,57	29,73	20,87*	18,33	23,17	10,13	0,90	0,20
23	67,33	60,50	30,07	29,97	23,15*	17,37	25,90	17,43	0,20	0,20
28	66,13	59,63	30,20	29,10	20,07*	16,83	26,67	17,73	0,20	0,30
30	67,37	60,43	29,70	24,95	20,40	16,30	28,87*	18,40	0,30	0,40
35	67,03	61,60	29,40	25,65	18,87	16,50	28,77	21,47	0,20	0,20
37	65,27*	52,50	29,87	28,43	19,13	17,20	25,10*	17,50	0,20	0,10
42	63,97	53,67	29,57	30,20	19,70	18,33	27,07**	18,30	0,10	0,10
44	63,37	53,37	27,57	32,20	20,50	19,40	29,57*	19,87	0,10	0,10
\bar{x}	64,63	58,34	29,37	21,11	20,40	18,07	24,44	18,79	2,45	0,22
SEM	0,89	7,52	1,33	4,06	1,13	0,98	1,08	2,21	0,07	0,09

Objaśnienia: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$

badania. Wyższe wartości tego wskaźnika u cieląt żywionych paszą z dodatkiem prebiotyku były przede wszystkim wynikiem zwiększenia liczebności limfocytów T (CD2⁺) we krwi tych zwierząt (tab. 2). Wzrost odsetka komórek CD2-pozytywnych był wyraźnie widoczny już po pierwszych 2 dniach podawania prebiotyku i utrzymywał się on do końca prowadzonych obserwacji, a różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w 37. dniu trwania doświadczenia.

W badaniach oznaczono ponadto subpopulację limfocytów Th (CD4⁺) i Ts/c (CD8⁺) (tab. 2). W obrębie subpopulacji komórek CD4⁺ nie zaobserwowano jednak istotnych zmian pomiędzy badanymi grupami cieląt. Natomiast szczegółowa analiza subpopulacji limfocytów CD8⁺ (supresorowo-cytotoksycznych) wykazała ich podwyższenie u cieląt otrzymujących dodatek prebiotyku (tab. 2). Wzrost ten był istotny statystycznie w 21., 23. i 28. dniu badania.

W przeprowadzonym doświadczeniu oceniono również odsetek limfocytów B (WC4⁺) zaangażowanych, jak wiadomo, w produkcję swoistych przeciwciał. W grupie cieląt kontrolnych odsetek tych limfocytów utrzymywał się na stałym poziomie, natomiast w grupie doświadczalnej wartości te wzrosły znacząco w 30., 37., 42. i 44. dniu stosowania dodatku preparatu Alphamune zawierającego prebiotyki, a różnice w porównaniu do kontroli były istotne statystycznie (tab. 2).

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano również istotny wzrost aktywności interleukiny 1 (IL-1) w surowicy krwi cieląt żywionych paszą z dodatkiem prebiotyków (Alphamune), notowany od 7. do 16. dnia trwania doświadczenia (tab. 2). Od wartości wyjściowej bliskiej zero (0,1 pg/ml) aktywność ta zwiększyła się w 7. dniu badania i utrzymywała się jeszcze na podwyższonym poziomie w 16. dniu obserwacji. W tym samym czasie u zwierząt kontrolnych nie stwierdzono znaczących zmian w poziomie interleukiny 1.

Zastosowanie jako dodatku do paszy cieląt

preparatu Alphamune zawierającego prebiotyki w postaci mieszaniny β -glukanów i β -mannanów spowodowało istotny wzrost odsetka wybranych subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej cieląt i aktywności IL-1. U cieląt otrzymujących ten preparat stwierdzono bowiem istotnie wyższe wartości zarówno w odniesieniu do odsetka limfocytów T, jak i B w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej. Jednak na szczególną uwagę zasługują zwłaszcza zmiany obserwowane odnośnie do limfocytów Ts/c, tj. supresorowo-cytotoksycznych, a także limfocytów B (WC4⁺). Limfocyty Ts/c odgrywają bowiem ważną rolę w procesie eliminacji komórek uszkodzonych pod wpływem mutacji oraz zakażonych zarazkami chorobotwórczymi (4, 12). Natomiast limfocyty B uczestniczą aktywnie w swoistej odpowiedzi immunologicznej związanej z produkcją odpowiednich przeciwciał.

Stwierdzone immunostymulujące działanie prebiotyków zostało również potwierdzone przez wielu innych autorów, zwłaszcza w odniesieniu do mannanoligosacharydów (3, 8, 9).

Działanie immunostymulujące prebiotyków związane jest głównie z pobudzaniem aktywności komórek żernych, np. neutrofilów i makrofagów za pośrednictwem β -glukanów, które łącząc się z receptorami powierzchniowymi tych komórek stymulują je do produkcji cytokin, takich jak interleukina 1. Interleukina 1 działa z kolei stymulująco na limfocyty T. Wydzielana jest ona głównie przez monocyty, makrofagi

Tab. 3. Wpływ paszy z dodatkiem prebiotyków na przyrosty masy ciała i wskaźnik wykorzystania paszy (FCR) cieląt

Parametr	Gr.	Badany okres (tygodnie)							
		przed doświadczeniem	podawanie prebiotyków						
			1	2	3	4	5	6	7
Średnia masa cieląt (kg)	I	74 ± 0,90	81,16 ± 1,52	86,80 ± 0,49	93,03 ± 1,02	99,66 ± 1,71	106,29 ± 1,22	113,06 ± 0,66	120,40 ± 0,46
	II	75 ± 0,81	79,70 ± 0,35	85,63 ± 1,23	89,63 ± 1,23	94,40 ± 0,85	99,40 ± 1,33	105,33 ± 0,60	111,20 ± 0,46
Średnie tyg. przyrosty m.c. (kg)	I	0	7,16 ± 0,90	5,64 ± 1,50	6,23 ± 1,20	6,63 ± 1,20	6,63 ± 1,10	6,77 ± 0,90	7,34 ± 1,50
	II	0	4,70 ± 0,70	5,93 ± 1,20	4,00 ± 0,80	4,77 ± 0,70	5,00 ± 0,90	5,93 ± 1,20	5,87 ± 1,10
Wskaźnik wykorzystania paszy – FCR (kg/kg)	I	0	5,50	5,53	5,49	5,54	5,54	5,54	5,53
	II	0	6,50	5,50	6,01	5,50	5,53	5,54	6,60

oraz limfocyty T i B. IL-1 jest silnym czynnikiem aktywującym i różnicującym limfocyty T. Znalazło to odbicie w zwiększonej liczebności tych komórek. Jednocześnie doszło do pobudzenia i zwiększenia odsetka poszczególnych subpopulacji limfocytów T, tj. CD4⁺ i CD8⁺.

Limfocyty T uaktywniane mogą być również za pośrednictwem innych cytokin, np. interleukiny 2 (IL-2), nie analizowanej jednak w badaniach własnych. IL-2 produkowana jest głównie przez limfocyty T CD4⁺, a także CD8⁺. Interleukina ta działa również aktywnie w procesie różnicowania i proliferacji limfocytów B. Wzrost odsetka limfocytów B obserwowany w badaniach własnych sugerować może więc udział i tej cytokiny w procesie proliferacji limfocytów jako następstwo immunostymulującego działania stosowanych prebiotyków. Badania w tym zakresie będą również w przyszłości kontynuowane.

W przeprowadzonych badaniach oprócz zmian wykazanych w statusie immunologicznym cieląt zaobserwowano również wyraźną poprawę efektów produkcyjnych w odniesieniu do przyrostów m.c. cieląt żywionych paszą z dodatkiem prebiotyków (tab. 3). U cieląt tych stwierdzono znacznie wyższą średnią masę ciała w grupie jako następstwo większych tygodniowych przyrostów masy tych zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. Średnie tygodniowe przyrosty masy ciała u cieląt w gr. I oscyływały bowiem w granicach od 5,64 ± 1,50 do 7,34 ± 1,5 kg i były one wyższe od kontrolnych średnio o 1,45 kg. Natomiast w grupie kontrolnej przyrosty te były generalnie niższe i w przebiegu doświadczenia utrzymywały się w przedziale od 4,0 ± 0,80 do 5,93 ± 1,2 kg.

Korzystny efekt produkcyjny u cieląt otrzymujących prebiotyki zaobserwowano również w odniesieniu do stopnia wykorzystania paszy (FCR), tj. ilości paszy (w kilogramach) przypadającej na kg przyrostu m.c. cieląt (tab. 3). Wskaźnik ten u zwierząt gr. I wynosił średnio 5,52 i był on niższy o 0,36 w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie kontrolnej kształtował się on bowiem na średnim poziomie równym 5,88. Tak więc w wartościach procentowych zużycie paszy u cieląt doświadczalnych było mniejsze o ponad 6% (6,12%). Należy również dodać, że cielęta otrzymują-

ce w paszy dodatek β -glukanów i MOS charakteryzowały się ponadto znacznie lepszą żywotnością i stanem kondycyjnym, a ich podatność na infekcje, w tym zwłaszcza układu pokarmowego i oddechowego, była zdecydowanie niższa niż u zwierząt kontrolnych.

Piśmiennictwo

- Abbott A.: Gut reaction. *Nature* 2004, 427, 284-286.
- Bednarek D., Szymańska-Czerwińska M.: Pasze lecznicze oraz inne środki żywienia zwierząt i dodatki paszowe alternatywą antybiotykowych stymulatorów wzrostu. *Życie Wet.* 2006, 81, 329-332.
- Collins M. D., Ribson G. R.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, 69, 1052S-1057S.
- Czekaj H., Samorek-Salomonowicz E., Kozdrun W., Bednarek D., Król K.: Analiza populacji limfocytów T metodą cytometrii przepływowej u kurcząt zakażonych reowirusami. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 704-705.
- Głębocka K., Roszkowski T.: Żywnienie trzody chlewnej w świecie bez antybiotykowych stymulatorów wzrostu. *Magazyn Wet. Suplement – Świnie* 2006, 47-48.
- Grela E. R.: Optymalizacja żywienia świń z wykorzystaniem nowej generacji dodatków paszowych. *Prace i Mat. Zoot.* 2004, 53-63.
- Grela E. R., Semeniuk V.: Konsekwencje wycofania antybiotykowych stymulatorów wzrostu z żywienia zwierząt. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 502-506.
- Heinrichs A. J., Jones C. M., Heinrichs B. S.: Effects of Mannan Oligosaccharide or Antibiotics in Neonatal Diets on Health and Growth of Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 4064-4069.
- Kuprechtova D., Illek J.: Effect of mannan oligosaccharides supplemented via milk replacer on the immune status and growth of calves. *Slov. Vet. Zbr.* 2006, 43, 311-313.
- Pejsak Z., Truszczyński M.: Przyczyny i konsekwencje wprowadzenia zakażu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu u świń oraz możliwość przeciwdziałania negatywnym skutkom ich wycofania. *Życie Wet.* 2006, 81, 380-382.
- Siwczyńska-Przeniosło M., Kwiatek K.: Prevalence of antimicrobial substances in animal feedingstuffs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2006, 50, 359-361.
- Wieliczko A., Kuczkowski M., Mazurkiewicz M.: Zachowanie się subpopulacji limfocytów T CD3⁺, CD4⁺ i CD8⁺ u kurcząt w przebiegu zakażenia *Salmonella Enteritidis*. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 528-529.

Adres autora: mgr Monika Szymańska-Czerwińska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: monika.szymanska@piwet.pulawy.pl