

Wpływ tylozyny i prebiotyków na aktywność fagocytarną granulocytów obojętnochłonnych krwi cieląt

MONIKA SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA, DARIUSZ BEDNAREK

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

Szymańska-Czerwińska M., Bednarek D.

Effect of tylosin and prebiotics on the phagocytic activity of polymorphonuclear blood leukocytes in calves

Summary

The aim of the study was to estimate the effect of tylosin and prebiotics (β -glucans and mannanooligosaccharides) added to feed on the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in calves. The study was performed on 36 clinically healthy, Black and White Lowland calves, aged 6-8 weeks. The animals were randomly divided into three equal groups. Calves in group I were fed a feedingstuff supplemented with tylosin. Group II received prebiotics, and group III (control) was fed the same feedingstuff without additives. The following phagocytic parameters were determined in the peripheral blood of the calves: phagocytic index (IF), the percentages of phagocytic (%kf) and NBT-positive cells, and the spontaneous migration of neutrophils (MG). The results showed that both prebiotics and tylosin caused a significant increase in the phagocytic activity of PMNL in the experimental groups. This was expressed by the higher values of the examined phagocytic parameters compared with the controls.

Keywords: tylosin, prebiotics, PMNL, phagocytosis, calves

Wprowadzenie zakazu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW) w żywieniu zwierząt wymusiło potrzebę poszukiwania nowych, najlepiej naturalnych stymulatorów odporności, które poprzez korzystny wpływ na układ immunologiczny zmniejszałyby podatność organizmu na choroby. Jak wykazały wcześniejsze badania, substancjami takimi mogą być prebiotyki, a wśród nich zwłaszcza β -glukany i mannanooligosacharydy, które stymulują znacząco odporność organizmu (12, 13, 19). Substancje te pozyskiwane są ze ścian komórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (21) i cieszą się szczególnym zainteresowaniem hodowców. W przeciwieństwie do prebiotyków charakteryzują się większą trwałością, a ich działanie nie jest uwarunkowane przeżywalnością po spożyciu. Jako jeden z wielu komponentów mogą być dodawane do różnych produktów paszowych (21). Szczegółowe mechanizmy działania zarówno tylozyny stosowanej do niedawna jako ASW, jak i prebiotyków nie zostały dotychczas poznane. Obecnie tylozyna może być stosowana nadal w formie doustnej jako substancja czynna w paszach leczniczych. Dotychczas dowiedziono, że antybiotyk ten wpływała korzystnie na zmiany w strukturze ścian jelit zwierząt, a poprzez

lepsze ich ukrwienie i poprawę resorpcji składników pokarmowych pozwalała uzyskać lepsze efekty produkcyjne (15). Ponadto, podobnie jak prebiotyki, tylozyna również uważana jest przez niektórych badaczy za substancję o właściwościach immunomodulujących (1).

Niniejsze opracowanie stanowi kontynuację wcześniejszych badań, w których wykazano korzystny wpływ prebiotyków i tylozyny na wybrane parametry odporności humoralnej, stan funkcjonalny żywca oraz efekty produkcyjne i ogólną zdrowotność cieląt (10-13).

Obecne badania miały na celu ocenę wpływu zarówno tylozyny, jak i prebiotyków na aktywność fagocytarną granulocytów obojętnochłonnych we krwi obwodowej cieląt.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 36 klinicznie zdrowych cielętach rasy ncb, w wieku 6-8 tygodni. Po dwutygodniowym okresie adaptacji po przebytych transporcie, zwierzęta zostały podzielone losowo na trzy równe grupy ($n = 12$). Do grupy I zaliczono cielęta, które przez okres 7 tygodni otrzymywały paszę z dodatkiem premiksu Tylan G 100 (Elanco). Jeden kilogram premiksu zawiera 100 g substancji

czynnej w postaci fosforanu tylozyny. Każdorazowo, stosując ten premiks, przygotowywano cielętom w grupie I mieszankę paszy treściwej (CJ) z tylozyną, na wzór pasz leczniczych. Podawano ją raz dziennie, na czczo w godzinach porannych, a jednorazowa dzienna dawka tylozyny na zwierzę wynosiła 9,4 mg/kg m.c. Z kolei cielęta z drugiej grupy eksperymentalnej (gr. II) żywione były paszą CJ z dodatkiem prebiotyku w postaci preparatu Alphamune (Alpharma), zawierającego w swoim składzie β -glukany (26%) i mannanooligosacharydy (MOS) (28%). Wspomniane prebiotyki podawano cielętom tej grupy również przez 7 tygodni w jednorazowych, dziennych dawkach, odpowiednio: β -glukany – 49 mg/kg m.c. i MOS – 52 mg/kg m.c. Pozostałe zwierzęta, które stanowiły grupę kontrolną, żywione były tą samą mieszanką CJ bez wspomnianych wyżej dodatków.

Krew do badań laboratoryjnych pobierano od cieląt z żyły szyjnej zewnętrznej, przez okres 7 tygodni, dwukrotnie w ciągu tygodnia. Zbierano ją do probówek z antykoagulantem (heparyna; 20 U/ml krwi).

Kompleksowe badanie zdolności fagocytarnych granulocytów obojętnochłonnych we krwi obwodowej cieląt

określano na podstawie ustalenia odsetka aktywnych w procesie fagocytozy komórek (% kf), ich indeksu fagocytarnego (IF) oraz odsetka granulocytów NBT dodatnich i pola spontanicznej migracji neutrofilów. Dwa pierwsze parametry, tj. % kf i IF oceniano przy zastosowaniu metody Ślopka (16) w odniesieniu do 100 przebadanych neutrofilów (PMNL), przy czym za komórki fagocytujące uznawano te, które w cytoplazmie zawierały co najmniej 3 pochłonięte bakterie. Natomiast indeks fagocytarny określano na podstawie średniej liczby pochłoniętych bakterii przypadających na jedną komórkę żerną.

Przy użyciu spektrofotometrycznego testu redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT; Nitro Blue Tetrazolium Test) wg Ramana i Polanda z późniejszymi modyfikacjami Czarnomysy-Furowicz i Furowicz (5) oznaczano odsetek granulocytów NBT-dodatnich we krwi obwodowej cieląt. Natomiast zdolność spontanicznej migracji granulocytów obojętnochłonnych cieląt (MG) oceniano metodą wg Søborga (cyt. za 6).

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statgraphics Centurion. W celu porównania grup eksperymentalnych z grupą kon-

Tab. 1. Średnie wartości wskaźników aktywności fagocytarniej u cieląt żywionych paszą z dodatkiem tylozyny (gr. I), prebiotyków (gr. II) i kontrolnych (gr. III)

Dzień badania	Parametry ($\bar{x} \pm SD$)											
	% kf grupa			IF grupa			NBT (%) grupa			MG (mm ²) grupa		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	82,00 ± 1,00	84,00 ± 2,65	82,00 ± 2,00	22,10 ± 0,85	22,07 ± 0,78	22,03 ± 2,04	12,09 ± 0,54	12,10 ± 0,64	12,25 ± 0,84	11,96 ± 1,13	11,43 ± 0,36	11,07 ± 0,51
2	80,00 ± 1,00	83,67 ± 2,08	81,00 ± 2,00	22,33 ± 0,57*	21,15 ± 0,83	20,67 ± 0,81	13,20 ± 0,60	15,54 ± 0,77*	12,43 ± 0,20	11,72 ± 1,03	12,10 ± 0,52*	9,69 ± 1,41
7	85,00 ± 1,00	94,67 ± 3,07*	83,33 ± 2,31	22,10 ± 0,70*	21,70 ± 0,61*	19,97 ± 1,15	14,30 ± 0,68	14,50 ± 1,42	13,25 ± 0,35	12,43 ± 0,73*	10,43 ± 0,30	10,22 ± 0,93
9	82,00 ± 3,00	94,67 ± 2,52*	80,00 ± 3,21	20,30 ± 0,26*	21,43 ± 0,40*	19,17 ± 0,64	13,51 ± 0,20	13,20 ± 1,15	11,86 ± 0,85	11,26 ± 1,52*	10,10 ± 0,74	9,23 ± 0,79
14	85,00 ± 1,00	95,33 ± 1,53*	81,00 ± 4,36	22,27 ± 1,01*	22,80 ± 0,20*	18,83 ± 0,71	13,38 ± 0,56	13,78 ± 0,63	13,05 ± 0,54	11,84 ± 0,97*	12,50 ± 0,41*	10,45 ± 0,42
16	86,00 ± 1,00	91,33 ± 2,52*	83,67 ± 1,53	21,80 ± 0,30*	22,70 ± 0,53*	19,53 ± 0,60	14,24 ± 0,53	14,78 ± 1,53*	12,33 ± 0,61	11,69 ± 0,73*	12,18 ± 0,73*	10,61 ± 0,76
21	83,33 ± 5,03	89,33 ± 6,43	80,33 ± 1,53	20,70 ± 0,26*	22,40 ± 0,36*	19,07 ± 0,96	13,79 ± 0,29	13,95 ± 0,17	12,78 ± 0,84	12,18 ± 0,62*	12,15 ± 0,34*	10,57 ± 0,46
23	82,33 ± 2,08	91,33 ± 3,06*	80,00 ± 1,00	22,93 ± 0,15*	23,93 ± 0,15*	20,28 ± 0,16	12,54 ± 1,00	12,21 ± 0,84	12,56 ± 1,26	13,92 ± 2,13*	13,72 ± 0,42*	10,99 ± 0,46
28	81,00 ± 3,06	88,67 ± 2,08*	80,00 ± 2,00	23,63 ± 1,33	27,50 ± 1,78*	21,87 ± 1,66	13,36 ± 0,38*	12,42 ± 0,55*	10,79 ± 0,37	11,10 ± 0,74	11,80 ± 0,66	11,76 ± 0,71
30	81,00 ± 1,00	89,00 ± 1,00*	81,00 ± 1,00	23,13 ± 0,90*	24,73 ± 0,47*	19,93 ± 0,15	13,68 ± 0,32*	13,23 ± 0,27*	12,06 ± 0,70	9,79 ± 1,08	11,13 ± 0,55*	9,48 ± 0,67
35	81,00 ± 1,53	87,67 ± 1,15*	82,00 ± 1,00	21,70 ± 1,47	24,47 ± 0,57	19,63 ± 0,60	12,74 ± 1,11	11,42 ± 1,66	10,99 ± 0,98	12,32 ± 1,65*	12,93 ± 1,30*	9,14 ± 0,60
37	83,33 ± 1,53*	87,00 ± 3,00*	79,00 ± 1,00	20,90 ± 0,10	23,63 ± 0,32*	20,30 ± 0,26	13,07 ± 0,73*	13,74 ± 1,02*	11,33 ± 0,34	11,90 ± 0,99*	10,87 ± 0,48*	9,28 ± 0,35
42	81,33 ± 1,53	83,67 ± 1,53*	80,00 ± 1,00	21,33 ± 1,05*	23,90 ± 0,89*	19,13 ± 0,32	14,98 ± 0,67*	13,91 ± 0,37*	11,59 ± 0,20	11,77 ± 0,44*	9,90 ± 0,21*	8,43 ± 0,33
44	82,33 ± 1,53*	81,00 ± 1,00	79,33 ± 1,53	20,57 ± 0,64	22,00 ± 1,71	19,67 ± 0,42	14,61 ± 2,37	14,88 ± 1,13*	11,68 ± 0,63	10,07 ± 1,20*	9,58 ± 0,37*	7,73 ± 0,33

Objaśnienie: * – różnice istotne statystycznie przy $\alpha = 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej

trolną wykonano analizę wariancji oraz wyznaczono najmniejsze istotne różnice LSD Fishera na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania wykazały, że podawanie prebiotyków (gr. II) i tylozyny (gr. I) wpłynęło istotnie na wzrost odsetka komórek fagocytujących (% kf) i indeksu fagocytanego (IF) oraz ich zdolności do spontanicznej migracji (MG) (tab. 1). U cieląt z grupy II między pierwszym („próba O”) a 14. dniem doświadczenia, kiedy to % kf był najwyższy, wartości analizowanego parametru wzrosły z $84,00 \pm 2,65$ do $95,33 \pm 1,53\%$. Natomiast indeks fagocytarny uległ zwiększeniu z $22,07 \pm 0,78$ do $27,50 \pm 1,78$ w 28. dniu doświadczenia. Wielkość pola migracji PMNL u cieląt z grupy II wzrosła z $11,43 \pm 0,36 \text{ mm}^2$ do $13,72 \pm 0,42 \text{ mm}^2$ w 23. dniu prowadzonych badań. Tendencje wzrostowe były obserwowane u cieląt grupy I, żywionych paszą z dodatkiem tylozyny, niemniej jednak % kf, IF, jak również wielkość pola spontanicznej migracji granulocytów kształtowały się na niższym poziomie niż w grupie II. Otrzymane wartości różniły się jednak istotnie w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, w przypadku cieląt grupy II zaobserwowano statystycznie istotny wzrost odsetka komórek NBT-dodatnich już w drugim dniu badania w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 1). Natomiast w grupie I istotne statystycznie różnice ($\alpha = 0,05$) odnośnie do tego parametru zanotowano dopiero w 28. dniu doświadczenia, przy czym najwyższa jego wartość stwierdzona została w 42. dniu badania i wynosiła ona $14,98 \pm 0,67\%$. Dla porównania: w grupie kontrolnej odsetek granulocytów NBT-dodatnich w tym samym czasie wynosił $11,59 \pm 0,20\%$.

O wyraźnych właściwościach immunostymulujących β -glukanów i tylozyny świadczą zaobserwowane w badaniach własnych zmiany w zakresie aktywności fagocytarnej neutrofilów we krwi obwodowej badanych cieląt. Oceniane parametry (% kf, IF, NBT, MG) wskazują jednoznacznie na zwiększenie tej aktywności. Należy jednak podkreślić, że zdecydowanie silniejsze zdolności fagocytarne wykazywały komórki żerne (neutrofile) cieląt, u których zastosowano w żywieniu dodatek prebiotyków. Wielu autorów zwraca też uwagę na poprawę aktywności fagocytarnej leukocytów u różnych gatunków zwierząt po eksperymentalnym podaniu im β -1,3/1,6 glukanów (3, 9, 14, 17, 18, 21, 22). Szczegółowa analiza wcześniejszych wyników własnych badań (13) wykazała znaczące pobudzenie zdolności fagocytarnych komórek żernych w przypadku cieląt żywionych paszą z dodatkiem tylozyny, co można wiązać z bezpośrednim wpływem TNF na ten proces, którego ilość zwiększała się istotnie u tych zwierząt (13). Jak wiadomo, TNF aktywuje neutrofile, zwiększając ich właściwości fagocytarne i przyspiesza ich uwalnianie ze szpiku. Stymuluje on także wytwarzanie reaktywnych form tlenu w cytoplaz-

mie komórek żernych i wzmacnia ich właściwości bakteriobójcze oraz cytotoksyczne (2). Rezultaty badań Baba i wsp. (1) wskazują również na wiodącą rolę tej i innych cytokin w immunomodulującym mechanizmie działania tylozyny.

Jak zaobserwowali Sakurai i wsp. (7), wpływ β -glukanów na aktywność fagocytarną komórek w dużej mierze uzależniony jest od dawki i drogi ich podania. W badaniach Milewskiego i wsp. (4) stosowano β -glukany *per os* u jagniąt, w dawce 80 mg/kg m.c.; badania własne wykazały, że zastosowanie podobną drogą β -glukanów już w dawce 49 mg/kg m.c. przynosi korzystne efekty w stymulacji układu immunologicznego cieląt. Z kolei dożylnie stosowanie β -glukanów indukuje istotnie makrofagi do produkcji H_2O_2 i IL-1 oraz wzmacnia zdolności bakteriobójcze zależne od tlenu, natomiast dootrzewnowa droga ich podania nie powoduje takiej reakcji. Dane literaturowe wskazują również, że u myszy, szczurów, ryb oraz jagniąt doustne podawanie β -glukanów wpływa efektywnie na poprawę aktywności fagocytarnej komórek żernych tych zwierząt (8, 14, 19, 20). Doniesienia te są jednak nieliczne i nie prezentują w pełni danych odnośnie do innych zwierząt, w tym zwłaszcza bydła. Badania własne dostarczają więc nowe informacje na ten temat.

Reasumując, uzyskane wyniki wskazują, że prebiotyki, jak również tylozyna pobudzały istotnie aktywność fagocytarną granulocytów obojętnochłonnych we krwi obwodowej cieląt (PMNL) w zakresie wzrostu odsetka komórek fagocytujących (% kf) i NBT-dodatnich, wartości indeksu fagocytarnego (IF) oraz pola spontanicznej migracji tych komórek (MG).

Piśmiennictwo

- Baba T., Yamshita N., Kodama H., Mukamoto M., Asada M., Nakamoto K., Nose Y., Mcgruder E. D.: Effect of tylosin tartrate (Tylan soluble) on cellular immune responses in chickens. *Poult. Sci.* 1998, 77, 1306-1311.
- Golań J., Jakóbiński M., Lasek W.: *Immunologia*. PWN, Warszawa 2002.
- Guz L., Sopińska A.: Wpływ β (1,3)-D-glukanu i lipopolisacharydu na odporność karpia przeciwko *Aeromonas hydrophila*. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 715-718.
- Milewski S., Wójcik R., Malaczewska J., Trapkowska S., Siwicki K. A.: Wpływ β -1,3/1,6-D-glukanu na cechy użyteczności mięsnej oraz nieswoiste humoralne mechanizmy obronne jagniąt. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 360-363.
- Raman U., Poland R. L.: A new micro-quantitative Nitro Blue Tetrazolium Test. *Ped. Res.* 1975, 9, 334-336.
- Richmond D. E., Doak P. B., North J. D. K.: Inhibition of leukocyte migration as an index of rejection in renal transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol.* 1973, 15, 17-25.
- Sakurai T., Ohno N., Yadomae T.: Intravenously administered (1-3)-beta-D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotium* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophage functions in vivo. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40, 2120-2124.
- Siwicki A. K., Anderson D. P., Rumsey G. L.: Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, 41, 125-139.
- Siwicki A. K., Kazuń K., Głański E., Terech-Majewska E., Baranowski P., Trapkowska S.: The effect of beta-1.3/1.6-glucan in diets on the effectiveness of anti-Yersinia Ruckeri Vaccine – an experimental study in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Pol. J. Food Nutri. Sci.* 2004, 54, 59-61.
- Szymańska-Czerwińska M., Bednarek D.: Wpływ tylozyny i prebiotyków na stan funkcjonalny żywca oraz parametry produkcyjne cieląt. *Medycyna Wet.*, w druku.

11. *Szymańska-Czerwińska M., Bednarek D.*: Wpływ tylozyny i prebiotyków na wybrane parametry hematologiczne i stan zdrowotny cieląt. *Medycyna Wet.* 2011, 67, 207-212.
12. *Szymańska-Czerwińska M., Bednarek D.*: Wpływ tylozyny i prebiotyków na wybrane parametry odporności humoralnej u cieląt. *Medycyna Wet.* 2011, 67, 275-278.
13. *Szymańska-Czerwińska M., Bednarek D., Zdzisińska B., Kandefer Szerszeń M.*: Effect of tylosin and prebiotics on the level of cytokines and lymphocyte immunophenotyping parameters in calves. *Cent. Eur. J. Immun.* 2009, 34, 1-6.
14. *Suzuki I., Tanaka H., Kinoshita A., Oikawa S., Osawa M., Yadomae T.*: Effect of orally administrated β -glucan on macrophage function in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1990, 12, 675-684.
15. *Śliżewska K., Biernasiak J., Libudzisz Z.*: Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków. *Zesz. Nauk. Politechniki Łódzkiej* 984, *Chemia spożywcza i biotechnologia* 2006, 79-91.
16. *Ślopek S.*: *Immunologia praktyczna*. PZWL, Warszawa 1971, 210-221.
17. *Świątkiewicz S., Korelski J.*: Dodatki paszowe o działaniu immunomodulacyjnym w żywieniu drobiu. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1291-1295.
18. *Świątkiewicz S., Świątkiewicz M.*: Zastosowanie fruktanów o właściwościach prebiotycznych w żywieniu zwierząt gospodarskich. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 987-990.
19. *Wójcik R.*: Effect of brewers' yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) extract on selected parameters of humoral and cellular immunity in lambs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2010, 54, 181-187.
20. *Wójcik R., Janowska E., Małaczewska J., Siwicki A. K.*: Effect of β -1,3/1,6-D-glucan on the phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2009, 53, 241-246.
21. *Wójcik R., Małaczewska J., Trapkowska S., Siwicki A. K.*: Wpływ β -1,3/1,6-D-glukanu na nieswoiste komórkowe mechanizmy obronne jagniąt. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 84-86.
22. *Yoshida T., Kruger R., Inglis V.*: Augmentation of nonspecific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J. Fish. Dis.* 1995, 18, 195-198.

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