

Humínové látky a ich vplyv na bunkovú imunitu prasiatok

Stanislav Hreško¹
Dagmar Mudroňová²
Alena Hreško Šamudovská³
Lukáš Bujňák⁴

¹ Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra výživy a chovu zvierat; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; stanislav.hresko@uvlf.sk

² Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra mikrobiológie a imunológie; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; dagmar.mudronova@uvlf.sk

³ Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra výživy a chovu zvierat; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; alena.hreskosamudovska@uvlf.sk

⁴ Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra výživy a chovu zvierat; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; lukas.bujnak@uvlf.sk

Grant: VEGA č. 1/0698/24

Název grantu: Sledovanie účinku kŕmnych doplnkových látok prírodného pôvodu a alternatívnych kŕmnych komponentov na produkciu a zdravie monogastrických zvierat.

Oborové zamereň: GH - Výživa hospodárskych zvierat

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Dva prípravky s obsahom humínových látok boli porovnané v súvislosti s ich účinkom na niektoré imunologické parametre u prasiatok. Celkovo 18 kusov krížencov (Slovenská biela ošípaná x Landrace) bolo rozdelených do troch skupín: kontrolná a dve pokusné. Prasiatka v pokusných skupinách boli kŕmené kŕmnymi zmesami s prídavkom dvoch rôznych prípravkov s humínovými látkami v množstve 6 g/kg: HUMAC® Natur AFM (skupina HN) a HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb (skupina HNM). V skupine HNM bola zaznamenaná signifikantne vyššia fagocytárna aktivita oproti kontrole. Signifikantne vyššie zastúpenie pomocných T lymfocytov a vyšší pomer CD4:CD8 bol zaznamenaný v skupine HN oproti skupine HNM. Efekt humínových látok bol výrazný iba na začiatku experimentu, na 27. deň nebol zaznamenaný významný vplyv podávaných látok na sledované parametre.

Kľúčová slova ošípaná, humínová látka, imunita, lymfocyt, fagocyt

1. ÚVOD

V záujme odborníkov z oblasti výživy zvierat je hľadať stále nové bioaktívne látky, ktoré by pozitívne ovplyvnili zdravie zvierat a zlepšili produkčné ukazovatele. K takýmto látkam sa už bezpochyby radia aj humínové látky, o ktoré vo výžive zvierat vzrástol mimoriadny záujem v posledných dvoch desaťročiach. Jedná sa o skupinu prírodných organických zlúčenín vznikajúcich v pôde. V prevažnej miere pozostávajú z frakcií humínových kyselín, fulvových kyselín a humínov, v menšej miere obsahujú ulmové kyseliny a v stopových množstvách minerálne látky, ako sú železo, mangán, meď a zinok (Aiken a kol. 1985, Stevenson 1994). Svoje uplatnenie si našli v poľnohospodárstve, priemysle, ale aj v oblasti ochrany životného prostredia. Pre svoje analgetické, antimikrobiálne a protizápalové účinky sa využívajú v humánnej a veterinárnej medicíne a vo farmakológii (EMEA 1999).

Rôznym druhom zvierat boli humínové látky podávané do krmiva (El-Husseiny a kol. 2008, Taklimi a kol. 2012, Abdel-Mageed 2012, Arif a kol. 2016) alebo do vody (Mirnawati a Marlida 2013, Lala a kol. 2017). V rámci týchto a podobných experimentov boli pozorované zlepšenia rôznych produkčných parametrov. Okrem toho boli u zvierat zaznamenané aj imunostimulačné účinky, ktoré sa prejavili zvýšenou aktivitou buniek imunitného systému (Cetin a kol. 2011, Dabovich a kol. 2003, Mudroňová a kol., 2020).

Cieľom tejto štúdie bolo porovnať vplyv dvoch prípravkov, obsahujúcich humínové látky, na vybrané ukazovatele imunitného profilu (percentuálne zastúpenie subpopulácií lymfocytov a fagocytárna aktivita fagocytov) u prasiatok.

2. MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité prasiatka krížencov Slovenskej bielej ošípanej x Landrace v celkovom počte 18 kusov. Na začiatku experimentu boli vo veku 34 dní a ich priemerná hmotnosť bola 11,89 kg/ks. Zvieratá boli umiestnené v priestoroch spĺňajúcich štandardné zootechnické požiadavky s priemernou teplotou $20 \pm 1,5$ °C a relatívnou vlhkosťou $68 \pm 4,5$ %. Počas celého pokusu boli prasatá kŕmené kompletnou kŕmnom zmesou na báze kukurice, pšenice, jačmeňa a sójového extrahovaného šrotu s nutričným zložením zodpovedajúcim normám pre príslušnú kategóriu zvierat. Za účelom experimentu boli zvieratá rozdelené do troch skupín: kontrolná skupina bez prídavku humínových látok (n=6), pokusná skupina „HN“ s prídavkom 0,6 % HUMAC® Natur AFM (Humac s.r.o., Košice, Slovakia) (n=6) a pokusná skupina „HNM“ s prídavkom 0,6 % HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb (Humac s.r.o., Košice, Slovakia) (n=6). V Tabuľke č. 1 sú uvedené charakteristiky použitých prípravkov.

Všetkým zvieratám bola na siedmy a dvadsiaty siedmy deň pokusu odobratá krv zo sinus ophtalmicus. Zrazeniu krvi bolo vo všetkých

vozkách zabránené prídavkom antikoagulantu (heparín 10 – 20 IU.ml⁻¹ v PBS, Zentiva, Česká republika). Vybrané imunologické parametre boli analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Biosciences, USA) a softvéru BD FACS Diva™. Hodnotené subpopulácie lymfocytov boli identifikované s použitím kombinácií priamo značených myšacích anti-prasacích monoklonálnych protilátok: CD3e/CD21 a CD4/CD8a (Tabuľka č. 2). Bunky boli identifikované na základe prítomnosti charakteristických znakov ako: T lymfocyty (CD3+), B lymfocyty (CD21+), pomocné T lymfocyty (Th; CD4+CD8-), cytotoxické T lymfocyty (Tc; CD4-CD8+) a dvojito pozitívne T lymfocyty (CD4+CD8+). Z výsledkov meraní bol taktiež vyhodnocovaný pomer lymfocytov CD4:CD8. Fagocytárna aktivita bola vykonaná pomocou komerčného testu Phagotest® (Celonix, Nemecko). Na štatistickú analýzu bola použitá jednocestná ANOVA (Tukey's multiple comparisons test) v softvéri GraphPad Prism 8.0. Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± štandardná chyba priemeru (SEM).

Tabuľka č.1 Charakteristika prípravkov s humínovými látkami

Parameter	HUMAC Natur AFM	HUMAC Natur AFM MycotoxiSorb
Veľkosť častíc	do 100 µm	do 200 µm
pH	5,8	5,8
Vlhkosť	max. 15 %	max. 21 %
Humínové kyseliny	min. 65 % v sušine	min. 65 % v sušine
Fulvové kyseliny	min. 5 % v sušine	min. 5 % v sušine
Hrubá vláknina	-	24,3 g/kg
Popol nerozpustný v HCl	-	3,69 %

Tabuľka č. 2 Protilátky použitých na analýzu pomocou prietokovej cytometrie

Protilátka	Fluorochróm	Klon	Objem na 50 µL krvi	Výrobca
anti-CD3e	FITC	BB23-8E6	4 µL	BD Biosciences, USA
anti-CD4	FITC	MIL 17	4 µL	AbD Serotec, UK
anti-CD8a	R-PE	MIL 12	2 µL	AbD Serotec, UK
anti-CD21	R-PE	BB6-11C9.6	2 µL	Suthern Biotech, USA

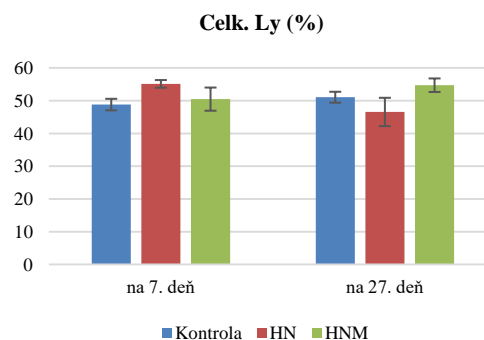
Realizácia výskumu bola schválená Etickou komisiou UVLF v Košiciach, č. povolenia EKVP/2023-01.

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

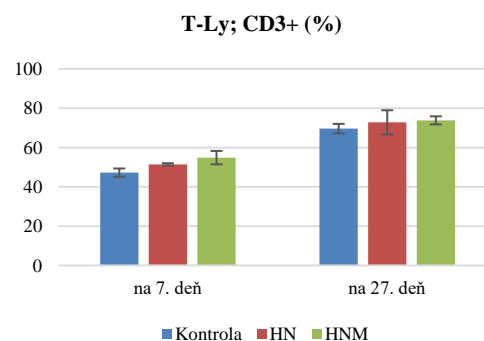
Vybrané imunologické parametre boli hodnotené na základe percentuálneho zastúpenia lymfocytov a ich subpopulácií (Grafy 1-7) a na základe fagocytárnej aktivity fagocytov (Graf 8). Celkový počet lymfocytov nebol prídavkom humínových látok významne ovplyvnený ani pri jednom z testovaných prípravkov. Na siedmy deň pokusu bol však v skupine HNM zaznamenaný trend zvýšenia T lymfocytov ($p = 0,0866$) pri porovnaní s kontrolnou skupinou (Graf 2). Ostatné subpopulácie lymfocytov neboli v porovnaní s kontrolnou skupinou na siedmi deň ovplyvnené ani jedným z podávaných prípravkov. Rovnako na 27. deň pokusu nebol pozorovaný významný vplyv podávaných prípravkov na percentuálne zastúpenie subpopulácií lymfocytov. Avšak v skupine HN bolo na siedmi deň pokusu zaznamenané významne vyššie zastúpenie pomocných T lymfocytov v porovnaní s HNM skupinou ($p < 0,05$) (Graf 4), ale v porovnaní s kontrolnou skupinou toto zvýšenie nebolo významné. Toto významne vyššie zastúpenie pomocných T lymfocytov v HN skupine oproti skupine HNM sa

odrkadlilo aj na hodnotení pomeru buniek CD4+ ku CD8+ (Graf 7). Vzájomným porovnaním týchto dvoch skupín bola v siedmom dni pokusu zaznamenaná štatistická významnosť ($p < 0,05$). V porovnaní s kontrolnou skupinou však v žiadnej pokusnej skupine nebol zaznamenaný významný rozdiel pomeru buniek CD4+ ku CD8+.

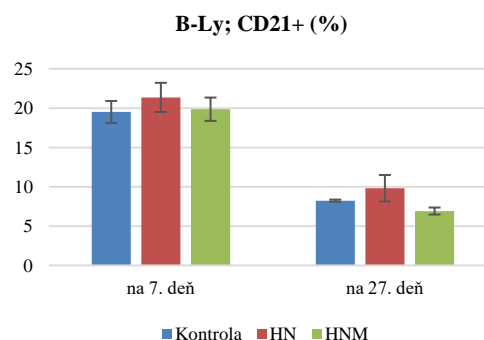
Graf č.1, Porovnanie percentuálneho zastúpenia lymfocytov



Graf č.2, Porovnanie percentuálneho zastúpenia subpopulácie T lymfocytov (CD3+)



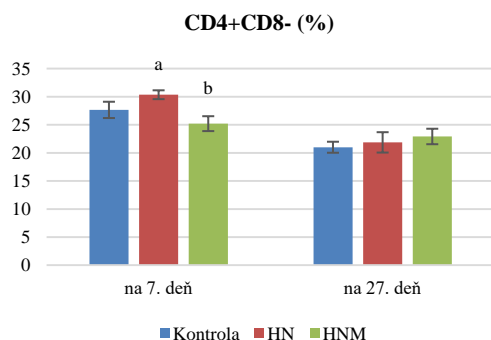
Graf č.3, Porovnanie percentuálneho zastúpenia subpopulácie B lymfocytov (CD21+)



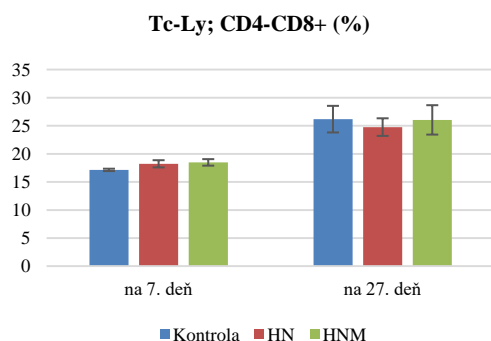
V našej predchádzajúcej štúdiu, v ktorej boli prasiatkam podávané humínové látky v prípravku HUMAC® Natur AFM (Humac s.r.o., Košice, Slovakia) v 0,5 % koncentrácii, bol taktiež pozorovaný trend v náraste počtu sledovaných subpopulácií lymfocytov (CD3+, CD21+, CD4-CD8+, CD4+CD8+) (Bujňák a kol., 2023). Zaznamenané bolo aj významné zvýšenie podielu T pomocných lymfocytov (CD4+CD8-) ($P < 0,001$) a nesignifikantne zvýšený pomer CD4+ k CD8+ v porovnaní s kontrolnou skupinou. V experimentálnej práci Mudroňová a kol. (2020) došlo k významnému zvýšeniu percentuálneho podielu CD4+ lymfocytov u brojerov kŕmených kŕmnom zmesou s prídavkom humínových látok v 0,8 % koncentrácii. Taktiež tu bol zaznamenaný významný

pokles CD8+ lymfocytov, čo viedlo k štatisticky vyššiemu pomeru CD4:CD8. Podobné výsledky boli zistené aj u hydiny, ktorá bola kŕmená krmivom s prídavkom humátu (0,15 %) (Cetin a kol. 2011). Vyšší relatívny počet lymfocytov bol pozorovaný aj u ošípaných, ktorých krmivo bolo suplementované humínovými látkami v 10 % koncentrácii (Wang a kol., 2008).

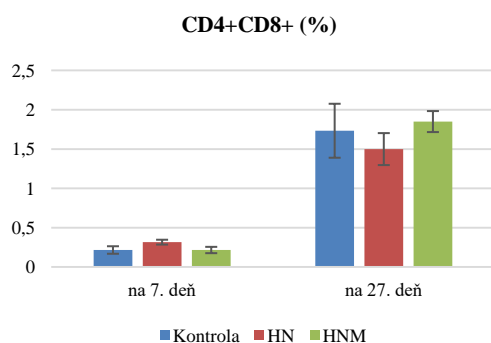
Graf č.4, Porovnanie percentuálneho zastúpenia subpopulácie pomocných T lymfocytov (CD4+CD8-)



Graf č.5, Porovnanie percentuálneho zastúpenia subpopulácie cytotoxických T lymfocytov (CD4-CD8+)



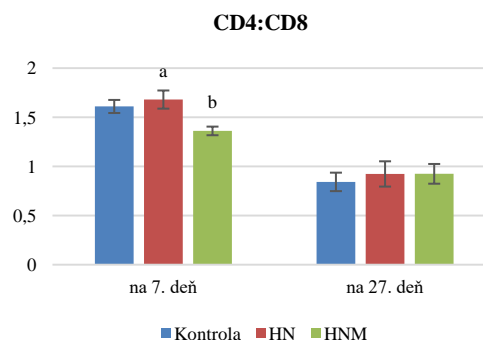
Graf č.6, Porovnanie percentuálneho zastúpenia subpopulácie dvojito pozitívnych T lymfocytov (CD4+CD8+)



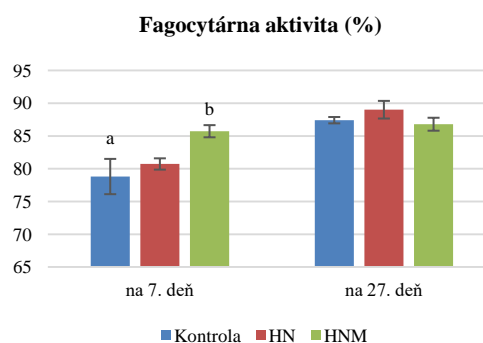
Na siedmy deň pokusu bola v skupine HNM pozorovaná signifikantne vyššia fagocytárna aktivita v porovnaní s kontrolnou skupinou (Graf 8). Na 27. deň pokusu sa však už tento vplyv prípravku HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb neprejavil. Prípravok HUMAC® Natur AFM (Humac s.r.o., Košice, Slovakia) fagocytárnu aktivitu nijako neovplyvnil počas celého pokusu, podobne ako v našej predchádzajúcej štúdií pri použití 0,5 % koncentrácie (Bujňák a kol., 2023). Pozitívny vplyv humínových látok na fagocytárnu aktivitu bol preukázaný vo viacerých štúdiách

vykonaných na hydine (ELnaggar a El-Kelawy, 2018; Mudroňová a kol., 2020; Mudroňová a kol., 2021).

Graf č.7, Porovnanie pomerného zastúpenia CD4:CD8 subpopulácií T lymfocytov



Graf č.8, Porovnanie fagocytárnej aktivity



Výsledky našej, ale aj rôznych iných štúdií naznačujú, že humínové látky môžu mať okrem iných aj imunostimulačný účinok. Pozitívny efekt, ktorý od prípravkov s humínovými látkami očakávame, sa pravdepodobne výraznejšie prejavuje u zvierat v rannom veku. Na účinok humínových látok môže vplyvať množstvo faktorov, akými sú: zloženie humátov, ich množstvo použité v prípravkoch, spôsob podávania v diétach, druh zvierat a podľa ELnaggar a El-Kelawyho (2018) aj chov zvierat v rôznych regiónoch sveta líšiacich sa podnebí. Imunomodulačný efekt humínových látok môže teoreticky vyplývať z tvorby komplexov humátov so sacharidmi, ktoré sa viažu na povrch T lymfocytov a NK buniek a ovplyvňujú ich funkcie, vrátane tvorby cytokínov, čím môžu ďalej ovplyvňovať ostatné bunky imunitného systému (Terratol 2019).

4. ZÁVER

Pozitívny imunomodulačný účinok prídavku humínových látok do kŕmnych zmesí prasiat naznačujú, okrem iných, aj výsledky predloženej štúdie. Avšak efekt prípravkov sa preukázateľne prejavil u prasidiatok iba na začiatku pokusu, teda krátko po odstave. Prípravok HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb výraznejšie ovplyvnil fagocytárnu aktivitu a preukázal pozitívny trend na zastúpenie T lymfocytov na siedmi deň pokusu. Rovnako na siedmi deň pokusu bolo vplyvom prídavku HUMAC® Natur AFM zvýšené zastúpenie pomocných T lymfocytov, významne v porovnaní s HNM skupinou.

Zdroje

1. ABDEL-MAGEED, M. A. A. Effect of dietary humic substances supplementation on performance and immunity of

- Japanese quail. *Egyptian Poultry Science*, 2012, vol. 32, no. 3, p. 645-660.
2. AIKEN, G. R. An introduction to humic substance in soil, sediment, and water. G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw, and P. MacCarthy: *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water.*, ed. Wiley, New York, NY, 1985, 1-13.
 3. ARIF, M., REHMAN, A., SAEED, M., EL-HACK, M. E. A., ARAIN, M. A., HASEEBARSHAD, M., ZAKRIA, H. M., ABBASI, I. H. Impacts of dietary humic acid supplementation on growth performance, some blood metabolites and carcass traits of broiler chicks. *Indian Journal of Animal Sciences*, 2016, vol. 86, no. 9, p. 1073-1078.
 4. BUJŇÁK, L., HREŠKO ŠAMUDOVSKÁ, A., MUDROŇOVÁ, D., NAĎ, P., MARCINČÁK, S., MASKALOVÁ, I., HARČÁROVÁ, M., KARAFFOVÁ, V., BARTKOVSKÝ, M. The effect of dietary humic substances on cellular immunity and blood characteristics in piglets. *Agriculture*, 2023, vol. 13, no. 3, p. 1-12.
 5. CETIN, E., GUCLU, B. K., CETIN, N. Effect of dietary humate and organic acid supplementation on social stress induced by high stocking density in laying hens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2011, vol. 10 no. 18, p. 2402-2407.
 6. DABOVICH, L. A., HULBERT, L., RUDINE, A., KIM, S., JI, F., McGLONE, J. J. Evaluation of nutraceutical effects on pig immunity: Effects of Promox. 2003 Southern Section ASAS meeting. Pork Industry Institute, Department of Animal and Food Science, Texas Tech University, Lubbock, 2003, TX (Vol. 79409).
 7. EL-HUSSEINY, O. M., ABDALLAH, A. G.; ABDEL-LATIF, K. O. The influence of biological feed additives on broiler performance. *International Journal of Poultry Science*, 2008, vol.7, no. 9, p. 862-871.
 8. ELNAGGAR, A.S. a EL-KELAWY, M.I. Effect of humic acid supplementation on productive performance, blood constituents, immune response and carcass characteristics of sasso chicken. *Egyptian Journal of Animal Production*, 2018, vol. 55, no. 1, p. 75-84.
 9. EMEA. Committee for veterinary medicinal products. Humic acids and their sodium salts. Available from www.emea.europa.eu/inf/medvet/vetdocs/055499en.pdf (Last modified April 21, 2008. Accessed February 1999).
 10. LALA, A. O., OKWELUM, N., OSO, A. O., AJAO, A. O., ADEGBENJO, A. A. Response of broiler chickens to varying dosage of humic acid in drinking water. *Journal of Animal Production Research*, 2017, vol. 29, no. 1, p. 288-294.
 11. MIRNAWATI, Y. R. a MARLIDA, Y. Effects of humic acid addition via drinking water on the performance of broilers fed diets containing fermented and non-fermented palm kernel cake. *Archiva Zootechnica*, 2013, 16(1), 41-53.
 12. MUDROŇOVÁ, D., KARAFFOVÁ, V., PEŠULOVÁ, T., KOŠČOVÁ, J., CINGELOVÁ MARUŠČÁKOVÁ, I., BARTKOVSKÝ, M., MARCINČÁKOVÁ, D., ŠEVČÍKOVÁ, Z., MARCINČÁK, S. The effect of humic substances on gut microbiota and immune response of broilers. *Food and Agricultural Immunology*, 2020, vol. 31, no. 1, p. 137-149.
 13. MUDROŇOVÁ, D., KARAFFOVÁ, V., SEMJON, B., NAĎ, P., KOŠČOVÁ, J., BARTKOVSKÝ, M., MAKIŠ, A., BUJŇÁK, L., NAGY, J., MOJŽIŠOVÁ, J., MARCINČÁK, S. Effects of dietary supplementation of humic substances on production parameters, immune status and gut microbiota of laying hens. *Agriculture*, 2021, vol. 11, no. 8, p. 744.
 14. STEVENSON, F. J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*; Wiley-Inter-Science: New York, NY, USA, 1994, p. 34-41.
 15. TAKLIMI, S. M. S. GHAHRI, H., ISAKAN, M. A. Influence of different levels of humic acid and esterified glucomannan on growth performance and intestinal morphology of broiler chickens. *Agricultural Sciences*, 2012, vol.3, no. 05, p. 663-668.
 16. TERRATOL, L.L.C. Effects of humic acid on animals and humans. Available online: https://fulvic.info/wp-content/uploads/2019/01/M-Terratrol_Article-1.pdf (accessed on 10.8.2022).
 17. WANG, Q., CHEN, Y. J., YOO, J. S., KIM, H. J., CHO, J. H., KIM, I. H. Effects of supplemental humic substances on growth performance, blood characteristics and meat quality in finishing pigs. *Livestock Science*, 2008, vol. 117, no. 2-3, p. 270-274.