

UNIwersytet PRZYRODniczy w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Weterynaria

lek. wet. Hubert Gorzkoś

Rozprawa doktorska

„Wpływ podawania probiotyków u krów mlecznych w okresie zasuszenia, okołoporodowym i wczesnej laktacji oraz u ich potomstwa, na wybrane parametry komórkowej odpowiedzi immunologicznej.”

“The effect of probiotic administration in dairy cows during the dry, perinatal and early lactation periods and in their offspring on selected parameters of the cellular immune response”

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze i Klinice Rozrodu Zwierząt

Promotor:

Dr hab. Piotr Brodzki prof. uczelni

Lublin, 2023

Załącznik Nr 2

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 20-03-2023

Podpis promotora Prof. Brodzki

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 20.03.2023

Podpis autora Hubert Gorkoś

* niepotrzebne skreślić

SPIS TREŚCI:

Skróty stosowane w pracy	3
1. Wstęp	4
1.1. Czynniki osłabiające odporność immunologiczną krów.....	9
1.2. Odporność nowonarodzonych cieląt.....	13
1.3. Strategie poprawy odporności u krów.....	15
1.4. Probiotyki w żywieniu zwierząt.....	17
2. Cel badań	21
3. Materiał i metody	
3.1. Zwierzęta doświadczalne.....	22
3.2. Materiał.....	25
3.3. Metody badawcze.....	26
3.3.1. Ocena aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów/makrofagów.....	26
3.3.2. Ocena wewnątrzkomórkowej bójczości komórek fagocytujących.....	26
3.3.3. Analiza cytometryczna.....	27
3.3.4. Fenotypowanie leukocytów metodą cytometrii przepływowej.....	28
3.3.5. Pomiar surowiczego amyloidu A w surowicy krwi.....	29
3.4. Analiza statystyczna.....	30
4. Wyniki	
4.1. Aktywność fagocytarna i wewnątrzkomórkowa bójczość komórek fagocytujących u krów doświadczalnych w przebiegu doświadczenia.....	30
4.2. Zachowanie się poszczególnych subpopulacji leukocytów u krów podczas trwania doświadczenia.....	35
4.3. Stężenie surowiczego amyloidu A u krów doświadczalnych w przebiegu doświadczenia.....	37
4.4. Aktywność fagocytarna i wewnątrzkomórkowa bójczość komórek fagocytujących u cieląt doświadczalnych w przebiegu doświadczenia.....	38
4.5. Zachowanie się poszczególnych subpopulacji leukocytów u cieląt podczas trwania doświadczenia.....	40
5. Dyskusja	42
6. Wnioski	54
7. Literatura	56
8. Streszczenie	72
9. Sumary	74

Skróty stosowane w pracy

CD4 - komórki pomocnicze T (Th)

CD8 - komórki T cytotoksyczne/supresorowe

CD11b - podjednostka receptora integryny αM

CD18 - podjednostka receptora integryny $\beta 2$

CD21 - limfocyty B

CD25 - łańcuch alfa receptora interleukiny 2 (aktywowane limfocyty B)

DHR - dihydrorodamina

DPP - dzień po porodzie

DPRZ - dzień przed porodem

DPZ - dzień przed zasuszeniem

E. coli – FITC - Escherichia coli znakowana fluoresceiną

FITC - izotiocyjanian fluoresceiny (fluorescein isothiocyanate)

Foxp3 - komórki T-regulatorowe

NEB - negatywny bilans energetyczny (negative energy balance)

NEFA - niezestryfikowane kwasy tłuszczowe (nonesterified fatty acids)

PE - fikoerytryna (phycoerythrin)

PMA - octan mirystynianu forbolu (12-mirystynianu 13-octan forbolu)

ROS - reaktywne formy tlenu (Reactive Oxygen Species)

RPE - R-fikoerytryna (R-phycoerythrin)

SAA - surowiczy amyloid A (Serum amyloid A)

SIF - średnia intensywność fluorescencji = (MFI - Mean Fluorescence Intensity)

TMR - dawka karmy całkowicie wymieszana (Total Mixed Ration)

1. Wstęp

Krowy mleczne biorąc pod uwagę cechy użytkowe, są zwierzętami wyjątkowymi pod względem możliwości ich wykorzystania produkcyjnego. Pozyskiwane są od nich cielęta, mleko, mięso a także produkty uboczne takie jak np. skóra, służące człowiekowi w życiu codziennym. Od wielu lat głównym przedmiotem zainteresowania jest jednak zdolność krów do produkcji mleka, wykorzystywanego na dużą skalę w przemyśle spożywczym. W hodowli bydła mlecznego, ciągle obserwowany jest trend dążenia do wzrostu wydajności i produkcji mleka. W dostępnej literaturze dominują prace badawcze, dotyczące sposobów wpływania na zwiększenie produkcji mleka, poprzez genetyczną selekcję ras krów na wysoko produkcyjne lub stosowanie zbilansowanych pasz i dodatków żywieniowych zwiększających wydajność mleczną (Oltenacu i Algers, 2005, Oltenacu i Broom, 2010). W ostatnich latach pojawiły się również publikacje dotyczące negatywnego wpływu wysokiej wydajności mlecznej na zdrowotność krów. Niestety wraz ze zwiększającą się wydajnością i postępującą ich eksploatacją, obserwowany jest wzrost zapadalności zwierząt w stadzie na choroby metaboliczne, niedoborowe oraz niepłodności (Dobson i in., 2007, Dracley i in., 2005, Nowak i in., 2006; Rearte i in., 2018). Aby możliwe było zapobieganie niepożądanym skutkom wysokiej wydajności krów, niezbędna jest wiedza odnosząca się do podstawowych zasad hodowli krów mlecznych, w której zwraca się szczególną uwagę na fizjologicznie następujące po sobie okresy: zasuszenie, okres okołoporodowy i laktacji, które są ściśle związane oraz warunkowane stopniem zaawansowania ciąży i porodem. Zgodnie z tymi okresami dokonywany jest użytkowy podział krów w stadzie, na odpowiednie sekcje (zależnie od możliwości), ułatwiające pracę ze zwierzętami (dojenie) oraz umożliwiające ich odpowiednie żywienie, ściśle dostosowane do danego okresu laktacji a tym samym do aktualnego zapotrzebowania indywidualnego zwierząt. Zasuszenie to czas odpoczynku od produkcji mleka (bez laktacji), w którym organizm krowy przygotowuje się do porodu oraz produkcji mleka w kolejnym okresie laktacji. Okres zasuszenia rozpoczyna się od czasu zahamowania do rozpoczęcia kolejnej laktacji. Przyjmuje się, że krowa w zasuszeniu powinna pozostawać ok. 8 do 9 tygodni. Dane dostępne w literaturze wskazują, że optymalny okres zasuszenia nie powinien być krótszy niż 40, a dłuższy niż 60 dni, gdyż wtedy można uzyskać istotną poprawę wydajności mlecznej w porównaniu z zasuszeniem trwającym dłużej lub krócej (Bachman i Schairer, 2002; Grummer i Rastani, 2004). W całym okresie zasuszenia rozróżnia się okres zasuszenia właściwego, trwający od początku zasuszenia tj. 7-8 tydz. do końca 4. tygodnia przed wycieleniem oraz część tak zwanego okresu przejściowego od początku 3.

tygodnia przed wycieleniem do porodu. Okres przejściowy trwa jeszcze do 3 tygodnia po porodzie i łączy się ściśle z okresem wczesnej laktacji, której szczyt osiągnęty jest przez krowy ok. 90 dnia po porodzie. Dostarczone w tym czasie składniki pokarmowe powinny zaspokoić potrzeby bytowe krów, umożliwić prawidłowy rozwój płodu i łożyska oraz przygotować krowę do rozpoczynającej się laktogenezy (Bell, 1995; Mashek i Beede, 2001). Odpowiednie żywienie jest bardzo istotne we wszystkich okresach laktacji, wydaje się jednak, że pierwszoplanową rolę odgrywa żywienie krów mlecznych w okresie okołoporodowym, który obejmuje ostatnie tygodnie zasuszenia do ok. 60 dnia po porodzie. Ze szczególnym uwzględnieniem okresu przejściowego – 3 tyg. przed porodem do ok. 3 tyg. po porodzie. W tym właśnie czasie w organizmach krów mlecznych zachodzą intensywne zmiany fizjologiczne modyfikujące cały metabolizm zwierząt (Dracley i in., 2005, Reddy i in., 2016, Wankhade i in., 2017). Intensywnie rozwijający się w tym okresie płód oraz rozpoczynająca się aktywność gruczołu mlekowego, a zwłaszcza zainicjowana synteza składników siary a następnie mleka (laktoza powstająca z glukozy), wywołuje gwałtownie rosnące zapotrzebowanie na substancje odżywcze i energetyczne znajdujące się w paszy. Zachodzące w tym czasie zmiany hormonalne (stałe zmniejszające się aż do porodu stężenie insuliny, wzrastające stężenie somatotropiny oraz spadek poziomu progesteronu i wzrost estrogenów i glikokortykosteroidów), szczególnie w okresie okołoporodowym powoduje osłabienie apetytu i zmniejszone pobieranie pokarmu (Dracley i in., 2005, Dracley i in., 2010; Wankhade i in., 2017). Wzrost zapotrzebowania na substancje odżywcze i energetyczne przy jednocześnie obniżonym pobieraniu suchej masy pokarmu (dry matter intake DMI), prowadzi do ujemnego bilansu energetycznego (negative energy balance - NEB) a często także do niedoborów mineralno-witaminowych. Organizm krowy dążąc do wyrównania niedoborów energetycznych zaczyna wykorzystywać tkankę tłuszczową. Wynikiem szybkiej mobilizacji lipidów jest wzrost stężenia niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (nonesterified fatty acids - NEFA), które po przejściu do wątroby przekształcane są na energię (w postaci ATP) pożytkowaną przez zwierzę, do wszystkich procesów życiowych. Jednak przy niedoborze glukozy wykorzystywanej głównie przez wymię, NEFA nie ulegają całkowitemu spalaniu w cyklu Krebsa, lecz ich rozkład zostaje zahamowany na etapie produkcji związków ketonowych (aceton, kwas acetoctowy, kwas β -hydroksymasłowy), których stężenie stopniowo rośnie, proporcjonalnie do rozpadu tkanki tłuszczowej, często prowadząc do ketozy. Ponadto przy stałym dopływie NEFA do wątroby, zdolność ich przetwarzania zostaje przekroczona, ulegają estryfikacji i odkładają się w wątrobie w postaci tłuszczu, co prowadzi

do klasycznego stłuszczenia wątroby i upośledzenia funkcji, tego tak bardzo ważnego narządu, co z kolei przyczynia się do innych problemów zdrowotnych okresu okołoporodowego (Dracley i in., 2005, Dracley i in., 2010; Wankhade i in., 2017; Nowak i in., 2006). Stopień niedoborów energii można łagodzić przez odpowiednie zarządzanie żywieniem krów. Celem okresu przejściowego jest stopniowe przejście z niskiego poziomu żywienia w okresie zasuszenia do intensywnego karmienia w czasie laktacji, co powinno wpływać korzystnie na stan zdrowia i produkcję mleka. Stopniowo zmniejsza się ilość pasz objętościowych (przeważających w okresie zasuszenia), podwyższając ilość składników pokarmowych w dawce żywieniowej dodając coraz więcej paszy treściwej. Ma to na celu stopniowe przestawienie organizmu krowy z paszy objętościowej na paszę dostarczającą duże ilości substancji energetycznych zgodnie z wzrastającym zapotrzebowaniem (Winnicki i in., 2012). Podstawowym źródłem energii w paszy są węglowodany. Przeżuwacze mogą wykorzystywać zarówno węglowodany strukturalne, włókniste (neutral detergent fiber fraction – NDF), występujące w ścianach komórek roślinnych (celuloza, hemiceluloza, lignina) jak i niewłókniste (non fiber carbohydrate – NFC), obecne w roślinach, jako materiał zapasowy (skrobia, sacharoza, fruktany). Wszystkie wymienione węglowodany podlegają procesom przemian i fermentacji w żwaczu pod wpływem enzymów wytwarzanych przez bakterie, drożdże oraz pleśnie. Oznacza to, że głównym miejscem trawienia i przemian węglowodanów jest żwacz, w którym odbywa się ich rozkład pod wpływem enzymów mikroflory. Procesy te określa się mianem fermentacji żwaczowej. Szczególne znaczenie na przebieg procesów fermentacji w żwaczu ma rodzaj węglowodanów (strukturalne lub niestrukturalne) oraz ich koncentracja w dawce pokarmowej, a przede wszystkim ich podatność na procesy rozkładu i fermentacji w żwaczu (Łopuszańska-Rusek i Bilik, 2007; Vilallba i in., 2021; Włodarczyk i Budvytls, 2011). Dawki o wysokiej zawartości włókna surowego odznaczają się niską wartością energetyczną i nie są wystarczające dla pokrycia zapotrzebowania na energię wysokowydajnych krów. Zwiększenie wartości energetycznej może być uzyskane w wyniku zwiększenia udziału niewłóknistych i łatwostrawnych węglowodanów (NFC) w dawce a także zastosowania alternatywnych źródeł energii w postaci chronionego tłuszczu lub jego soli, glikolu propylenowego, glicerolu, propionianu wapnia (Łopuszańska-Rusek i Bilik, 2007; Vilallba i wsp., 2021; Wankhade i in., 2017; Włodarczyk i Budvytls, 2011). W okresie zasuszenia dawka żywieniowa zawiera głównie węglowodany włókniste, dlatego flora żwacza składa się przede wszystkim z bakterii celulolitycznych z małą tylko populacją bakterii amylolitycznych. Te ostatnie mają zdolność

wytwarzania kwasu mlekowego, ale również jego wykorzystywania i utylizacji. Przy gwałtownej zmianie w dawce pokarmowej proporcji na korzyść węglowodanów niewłóknistych NFC - fermentujących, szybko namnażają się bakterie wytwarzające kwas mlekowy, natomiast bakterie wykorzystujące mleczan adoptują się wolniej (ok. 3 do 4 tygodni). Ponadto tuż po porodzie, pobieranie suchej masy jest stosunkowo niskie a jej pasaż ze żwacza do dalszych części przewodu pokarmowego wolny, sprzyja to fermentacji i akumulacji kwasu w żwaczu, dlatego istnieje ryzyko powstania podostrej kwasicy żwacza. To z kolei przyczynia się do dalszego osłabienia apetytu, pogorszenia strawności paszy a nawet ochwatu we wczesnym okresie poporodowym.

Produkty powstające w wyniku fermentacji, mają nie tylko wpływ na ekosystem żwacza i jego funkcjonowanie, wydajność i skład mleka, ale również na stan zdrowotny krów (Łopuszańska-Rusek i Bilik, 2007; Vilallba i in., 2021; Włodarczyk i Budvytls 2011). O prawidłowym zdrowiu krów mlecznych decyduje wiele czynników zarówno genetycznych jak i środowiskowych. Jednak, jak zostało wcześniej wspomniane główną rolę rzutującą na całą późniejszą laktację, odgrywa okres okołoporodowy. W tym czasie w organizmie krów mlecznych zachodzą intensywne zmiany fizjologiczne i hormonalne modyfikujące cały metabolizm zwierząt, które mogą prowadzić do powstawania wielu chorób, zwłaszcza metabolicznych, obniżając opłacalność hodowli krów mlecznych (Diez-Fraile i in., 2003; Drackley, 1999; Goff 2006; Ingvarsten i Andersen, 2000; Sordillo i in., 2009; Wankhade i in., 2017). Liczne opublikowane badania potwierdziły, że w okresie okołoporodowym ma miejsce najwyższe nasilenie na występowanie chorób metabolicznych i niedoborowych takich jak porażenie poporodowe, hipomagnezemia, stłuszczenie wątroby, ketoza a także zapalenie wymienia, zapalenie macicy oraz przemieszczenie trawieńca (Drackley, 1999; McArt i in., 2012; Mulligan i Doherty, 2008; Ribeiro i in., 2013, Stevenson, 2000). W okresie tym u krów mlecznych dochodzi ponadto do czasowego upośledzenia funkcji immunologicznych (immunosupresja) (Goff i Horst, 1997; Kimura i in., 2006). Część autorów uważa, że osłabiona odpowiedź immunologiczna, występująca u krów mlecznych w okresie okołoporodowym, jest ściśle związana z wymienionymi chorobami metabolicznymi oraz predysponuje do wystąpienia stanów zapalnych wymienia oraz macicy łącznie z zatrzymaniem łożyska (Goff 2006; Goff i Horst, 1997; Lewis, 1997). Nasza wiedza na temat dynamiki i patofizjologii immunosupresji napotkanej w tym okresie jest nadal niewystarczająca, chociaż ciągle ewoluuje. Na podstawie badań wielu autorów można

zaobserwować, że wpływ na funkcjonowanie układu immunologicznego w okresie okołoporodowym ma kilka głównych czynników.

1.1. Czynniki osłabiające odporność immunologiczną krów.

Pierwszym i wydaje się najważniejszym z nich jest wysoki poziom mediatorów stresu, do których zaliczyć należy noradrenalinę, adrenalinę i glikokortykoidy. Ich nieznaczny wzrost obserwowany jest już kilkanaście dni przed porodem, a wraz ze zbliżającym się porodem stężenie ich wzrasta osiągając szczyt w trakcie i tuż po porodzie. Noradrenalina i adrenalina stymulują wytwarzanie cytokin przeciwzapalnych, takich jak transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β) i interleukina-10 (IL-10), które z kolei hamują wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak interferon α (IFN - α), czynnik martwicy nowotworu - α (TNF- α) i interleukina-12 (IL-12). Hamowanie wytwarzania prozapalnych cytokin powoduje immunosupresję, selektywne hamowanie odporności komórkowej i promowanie odporności zależnej od przeciwciał (Elenkov i Chrousos, 2002; Kaspruwicz i in., 2000, Madden i in., 1995). Wysoki poziom kortyzolu wpływa na odpowiedź immunologiczną poprzez bezpośrednie hamowanie proliferacji limfocytów B, obniżenie ilości limfocytów T (CD2, CD4 i CD8), osłabienie działania cząsteczek dopełniacza i zakłócanie funkcji immunoglobulin (Alieri i in., 2016; Mallard i in., 2009). Uważa się, że zmiany poziomu krążącego kortyzolu w okresie okołoporodowym odgrywają kluczową rolę w rozwoju immunosupresji, zwiększając podatność krów na choroby infekcyjne (Lewis, 1997; Mallard i in., 2009). Badania wykazały również, że krążące glikokortykoidy indukują obniżenie ekspresji L-selektyny (CD18) na powierzchni neutrofilii, zmniejszając ich zdolności chemotaktyczne a w rezultacie zaburzając odpowiedź immunologiczną (Burton i in., 1995; Burton i in., 2000; Mallard i in., 2009; Preisler i in., 2000b). Najsilniejszym czynnikiem narażającym krowy na stres jest oczywiście czas przygotowywania się zwierzęcia do porodu oraz sam akt porodowy gdzie wymienione mediatory stresu są odpowiedzialne za stymulację układu neurohormonalnego: podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowego (Diez-Fraile i in., 2003). Dzięki temu zmienia się stopniowo status hormonalny organizmu zwierzęcia z ciążowego (blok progesteronowy) na przygotowujący i wywołujący poród (ustąpienie bloku progesteronowego) (Alieri i in., 2016; Diez-Fraile i in., 2003). Połączenie wielu czynników stresogennych powstałych w okresie okołoporodowym, między innymi niedoborów żywieniowych, samego porodu a także wynikających z procedur zarządzania stadem w okresie okołoporodowym np. przemieszczanie krów do stada dojenia, mogą zarówno zwiększyć, jak i wydłużyć skalę immunosupresji, co dodatkowo zwiększa podatność zwierząt na choroby i negatywnie

wpływa na zdolność krów do przezwyciężenia choroby i wyzdrowienia. Jednak okazuje się, że nie tylko poród wiąże się z immunosupresją, ale zachodzą również inne procesy (opisane poniżej), przebiegające z wydzielaniem mediatorów stresu, bądź znaczącą utratą wartościowych składników organizmu, osłabiające odporność zwierzęcia (Alieri i in., 2016).

Kolostrogenera jest bardzo ważnym procesem fizjologicznym zachodzącym podczas okresu okołoporodowego, który obejmuje selektywny transfer immunoglobulin (Ig) z krwi matki do wydzieliny gruczołu mlekowego. Stwierdzono, że stężenie całkowitej Ig w sianie jest około 5–10 razy wyższe niż stężenie w surowicy krwi krów, stanowią one ok. 90% wszystkich białek występujących w sianie (Hurley i Thiel, 2011; Larson i Fox, 1992). Główną Ig przenoszoną do wydzieliny wymienia jest IgG1 i uważa się, że jej selektywny transfer z krążenia do wymienia jest regulowany przez szereg czynników, w tym zmiany poziomu progesteronu, estrogenów i prolaktyny, jakie obserwuje się w okresie okołoporodowym (Kacs Kovics, 2004). Podczas kolostrogenery dochodzi do masowego przeniesienia IgG1 z krążenia macicznego do siary. Sugeruje to, że przy zmniejszonej zdolności do odtwarzania immunoglobulin organizm matki może ulegać immunosupresji. Pomimo, że matka naraża się na osłabienie odporności, mechanizm przechodzenia ciał odpornościowych do siary jest jedynym znaczącym mechanizmem chroniącym potomstwo, rodzące się z bardzo słabo funkcjonującym układem immunologicznym. Immunoglobuliny, laktoferyna, β -laktoglobuliny, sfingomieliny i oligosacharydy zawarte w sianie, wypijane przez cielęta wchłaniają się z przewodu pokarmowego do krwi i stanowią bezpośrednią ochronę dla noworodka przed zakażeniami (Marnila i Korhonen, 2011). Pomimo możliwego transferu ciał odpornościowych z krwi matki do płodu poprzez sianę, rodzące się cielę może nadal być narażone na niedobory odporności i infekcje. Może to być wynikiem wypicia niedostatecznej ilości siary, sianą ze zbyt małą ilością ciał odpornościowych, lub też zbyt późnym wypiciem siary, kiedy wchłanianie z przewodu pokarmowego jest już ograniczone. Jakość siary pod względem wsparcia immunologicznego noworodka, określa się na podstawie zawartości Ig, minimalna ich ilość nie powinna być niższa niż 50 mg/ml (McGuirk i Collins, 2004). W przeciwnym razie nowo narodzone cielę pomimo wypicia siary nie jest w stanie poradzić sobie z ewentualną infekcją. Dane literaturowe wskazują, że ilość Ig w sianie jest uzależniona od rasy krów, ale również stanowi cechę indywidualną każdego osobnika. Krowy wysokoprodukcyjne, jak holsztyńsko-fryzyjskie wytwarzają sianę o zbyt niskiej zawartości Ig aby mogła stanowić pełną ochronę dla cieląt (Muller i Ellinger, 1981; Pritchett i in., 1991).

Badania Morrill i in. (2012) wykazały, że tylko 30% rodzących krów w stadzie spełnia minimalne zalecenia pod względem zawartości Ig w siarze.

Laktogeneza to następujący po kolostrogeniezie, proces wyjątkowo obciążający organizm krowy, ponieważ do produkcji mleka przekazywane są wszystkie niezbędne składniki wchodzące w jego skład: laktoza, kazeina, kwasy tłuszczowe oraz makroskładniki odżywcze (białka, węglowodany i lipidy) jak również witaminy i minerały obecne w mleku oraz niezbędne do produkcji wymienionych składników (Zerbe i in., 2000). Proces produkcji mleka a szczególnie przenikanie wymienionych składników do mleka, jest regulowane przez wydzielanie niektórych hormonów, takich jak glikokortykoidy, hormon wzrostu (GH) i insulinopodobny czynnik wzrostu – 1 (IGF-1) (Tucker, 2000; Tucker, 1981). Podwyższony poziom kortykosterydów podczas laktogenezy, osłabia układ immunologiczny krów (Preisler i in., 2000a; Preisler i in., 2000b). Stres związany z początkiem laktacji (przemieszczenie do innej grupy krów, dojenie), może dodatkowo wywołać wydzielanie kortyzolu wpływając negatywnie na odpowiedź immunologiczną. Badania przeprowadzone, przez Kimura i in. (1999) porównujące krowy w laktacji i po mastectomii wykazały, że osłabiona aktywność komórek układu immunologicznego, zawsze występuje u krów na początku laktacji niezależnie czy produkcja mleka jest kontynuowana czy nie, a stres metaboliczny i utrata istotnych składników (glukoza, białka, związki mineralne, witaminy), nasila osłabione funkcje komórek immunologicznych oraz opóźnia powrót prawidłowych funkcji tych komórek. Początkowa faza laktacji wiąże się również ze zmianą kierunku odpowiedzi immunologicznej z komórkowej (Th1) na humoralną (Th2) (Paibomesai i in., 2013; Piccinini i in., 2004). Potwierdzają to badania innych autorów, które wykazały, że aktywność hormonu wzrostu może selektywnie zwiększać odpowiedź immunologiczną poprzez zwiększenie produkcji immunoglobulin IgG1 i IgG2 (Burton i in., 1991; Mallard i in., 2009). Podobnie wytwarzana podczas laktogenezy prolaktyna ma działanie immunostymulujące, co może ułatwiać powrót prawidłowych funkcji układu immunologicznego w późniejszym okresie laktacji (Freeman i Kanyiesk, 2000).

Kolejnym stanem wpływającym na układ odpornościowy krów jest hipokalcemia. Organizm krów mlecznych w ostatnim trymestrze ciąży ma bardzo duże zapotrzebowanie na wapń, dlatego, że najintensywniejszy rozwój płodu (mineralizacja kości) zbiega się wtedy z kolostrogenią. Organizm krowy potrzebuje ok. 12 g wapnia na dzień na rozwój szkieletu płodu, oraz 2,3 g na każdy litr wyprodukowanej siary. Po porodzie organizm musi dostarczyć powyżej 30 g wapnia dziennie do produkcji mleka (Aleri i in., 2016). Tak duże

zapotrzebowanie na wapń powoduje, że mechanizmy utrzymujące homeostazę wapnia w organizmie krów, nie działają sprawnie, co powoduje u większości z nich hipokalcemię subkliniczną lub kliniczną. Ogólnie, krowy z hipokalcemią mają podwyższone stężenia kortyzolu we krwi (Horst i Jorgensen, 1982), co może zwiększyć stopień immunosupresji wywołany samym porodem (Goff i Horst, 1997). U zwierząt z hipokalcemią rozpoznanie patogenu przez komórki odpornościowe krwi obwodowej jest opóźnione (Kimura i in., 2006). Zmniejszone stężenie wapnia w surowicy u krów w okresie okołoporodowym było również związane ze zmniejszoną aktywnością neutrofilów i zwiększoną podatnością krów na inne zaburzenia okołoporodowe (Martinez i in., 2012; 2014). Ponadto hipokalcemia poprzez negatywny wpływ na kurczliwość mięśni może usposabiać do zakażeń. Związana z tym utrata napięcia zwieracza strzyków zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia wymienia. Natomiast osłabiona kurczliwość lub nawet bezwład macicy, prowadzi do zatrzymania łożyska lub ogranicza samooczyszczanie się tego narządu po porodzie i usposabia do wystąpienia stanu zapalnego macicy (Goff i Horst, 1997). Takie interakcje podkreślają związki między chorobami metabolicznymi i zakaźnymi.

Ujemny bilans energetyczny u wysokowydajnych krów w okresie okołoporodowym jest stałym zjawiskiem nawet u krów z dobrym systemem żywienia. Dzieje się tak, ponieważ substancje energetyczne pochodzące z pokarmu nie zaspakajają zapotrzebowania energetycznego podczas laktacji (Ingvarlsen, 2006; Ingvarlsen i Moyes, 2015). Badania niektórych autorów wykazały właśnie, że właściwa dieta z prawidłową suplementacją nie była w stanie uchronić krów przed ujemnym bilansem energetycznym i problemami metabolicznymi, co może sugerować związek z właściwościami genetycznymi wysokowydajnych krów. Nie są one w stanie z pokarmu pokryć zapotrzebowania na genetycznie uwarunkowaną bardzo wysoką produkcję mleka (Dobson i in., 2007; Pryce i in., 1999; Roche i in., 2009). Przy niedoborach energetycznych, organizm szuka innych źródeł energii wykorzystując w pierwszej kolejności tkankę tłuszczową a następnie mięśnie (Marczuk i in., 2018). Skuteczna mobilizacja tkanki tłuszczowej jest ograniczona ze względu na ilość kwasów tłuszczowych, które wątroba może utleniać w cyklu Krebsa. Obecne we krwi w nadmiarze wolne kwasy tłuszczowe mogą tworzyć z jonami wapnia i magnezu nieprzyswajalne chelaty, które stanowią dodatkowe obciążenie dla wątroby. Przy dużych niedoborach energetycznych rozpad tkanki tłuszczowej jest zbyt szybki i dochodzi do powstawania ciał ketonowych: acetonu, aceto-octanu i β -hydroksymaślanu, powodujących ketozę (Bobe i in., 2004; Ingvarlsen i in., 2003; Marczuk i in., 2018). Natomiast przy

postępujących niedoborach i dalszym rozpadzie tkanki tłuszczowej dochodzi do nagromadzenia się triglicerydów w wątrobie, powodując stłuszczenie zaburzające jej funkcję (Sordillo i in., 2009). Problem może się dodatkowo nasilać u zwierząt nadmiernie otluszczonych (BCS > powyżej 4 w 5-stopniowej skali) lub wychudzonych (BCS ≤ 2 skala 1–5) (Roche i in., 2009). Krowy takie są bardziej narażone na immunosupresję i zwiększone jest ryzyko wystąpienia u nich chorób, takich jak stłuszczenie wątroby i ketoza w okresie okołoporodowym (Ingvarlsen, 2006; Ingvarlsen i in., 2003; Mulligan i Doherty, 2008). Gromadzenie się w organizmie niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) negatywnie wpływa na stymulację apetytu w mózgu, a także zwiększa stężenie glikokortykoidów w krwi, co wzmacnia uwalnianie innych mediatorów prozapalnych, hamujących funkcje immunologiczne (Ingvarlsen i Moyes, 2015; Sordillo i in., 2009; Ster i in., 2012). Ujemny bilans energetyczny jest głównym czynnikiem przyczyniającym się do immunosupresji u bydła mlecznego i zaleca się nawet ocenę stężenia metabolitów przemiany energii w celu kontroli i ewentualnego leczenia immunosupresji (Ingvarlsen i Moyes 2013; 2015). Im mniejszy jest niedobór energetyczny tym mniejsze są idące za tym konsekwencje zdrowotne dla krowy, dlatego utrzymanie spożycia karmy przez te zwierzęta na stałym wysokim poziomie w okresie okołoporodowym ma kluczowe znaczenie dla utrzymania zdrowia krów po ocieleniu (Colditz, 2002). Badania niektórych autorów potwierdziły przypuszczenia, że istnieje ścisły związek między ujemnym bilansem energetycznym, zaburzeniami metabolicznymi i chorobami zakaźnymi u krów (Butler i Smith, 2014; Yasui i in., 2014).

1.2. Odporność nowonarodzonych cieląt.

U nowo narodzonych cieląt, jedynie wrodzone mechanizmy są odpowiedzialne za odporność na infekcje. Adaptacyjny układ odpornościowy jest, co prawda w pełni rozwinięty po urodzeniu, ale nie może funkcjonować na tak wydajnym poziomie jak to ma miejsce w przypadku krów dorosłych, nawet przez kilka pierwszych tygodni życia (Osorio i wsp. 2020; Chase i in. 2008). Rozwój odporności nabytej zależy od stymulacji antygenowej, natomiast podczas ciąży płód w macicy ma bardzo ograniczony kontakt z obcymi antygenami, dlatego cielę rodzi się z układem odpornościowym naiwnym antygenowo (bez komórek pamięci immunologicznej) (Osorio i in. 2020; Chase i in. 2008). Zatem adaptacyjne komórki odpornościowe u noworodków cieląt są niezdolne do rozpoznawania obcych antygenów. Dopiero po rozpoznaniu przez komórki układu wrodzonego, obce komórki są fagocytowane, trawione, a następnie prezentowane w tkankach limfoidalnych, czego efektem są powstające

komórki pamięci immunologicznej. Aktywacja systemu adaptacyjnego u cieląt w okresie poporodowym, jest dodatkowo utrudniona przez wysokie stężenia hormonów (np. kortyzol, prostaglandyna E2) i cytokiny przeciwzapalne (np. IL4 i IL10) wytwarzane podczas ciąży i porodu, które hamują aktywność limfocytów T i zaburzają odpowiedź adaptacyjną w kierunku TCD4+ - pomocnicza odpowiedź typu 2. (Chase i in., 2008; Gelsinger i Heinrichs 2017; Schroder i in., 2004). W związku z tym nowonarodzone cielęta przez kilka pierwszych tygodni życia, są podatne na infekcje i potrzebują w tym czasie wsparcia. Pomoc ta jest częściowo udzielana przez matkę w postaci siary, która składa się głównie z przeciwciał, cytokin i komórek odpornościowych. Spożycie siary zapewnia noworodkom ochronę immunologiczną przez co najmniej pierwsze 2–4 tygodnie życia (Chase i in., 2008). Bierny transfer odporności z matki na noworodka jest niezbędny do jego przeżycia (Edelman 1973; Mostov 1994). U zdrowych, urodzonych w terminie cieląt, wchłanianie siary następuje przez komórki jelitowe poprzez noworodkowy receptor FcRn i endocytozę za pomocą „wakuoli transportowych” (Baintner 2007, Israel i in., 1995). Ta zdolność wchłaniania zaczyna spadać od 6 do 12 godzin po urodzeniu i kończy się po 48 godzinach (Baintner 2007; Sangild 2003). Pomimo, wypicia siary cielęta często zapadają na choroby infekcyjne (głównie układu oddechowego i pokarmowego), które są dużym problemem w hodowli bydła.

Podjęmowane są próby poprawy funkcjonowania układu immunologicznego cieląt przez stosowanie szczepień przeciwko konkretnym patogenom wywołującym największe straty w pogłowie cieląt. Stosowanie skutecznych szczepień jest jednak utrudnione; z powodu obecności znacznych poziomów przeciwciał matczynych, które neutralizują wprowadzane antygeny; czynników hormonalnych hamujących odporność oraz braku pełnej kompetencji immunologicznej noworodków. Zakłóca to prawidłowe działanie szczepionek i powstawanie pełnej odpowiedzi immunologicznej zapobiegającej infekcjom (Chase i in., 2008; Fulton i in., 2004; Ellis i in., 1996).

Innym sposobem poprawy zdrowotności cieląt po urodzeniu jest zastosowanie preparatów probiotycznych. Początkowo probiotyki u cieląt stosowano w przypadku biegunek jako drobnoustroje rywalizujące z patogenami w jelitach lub w celu odbudowy prawidłowej bioty jelitowej po antybiotykoterapii (Abu-Tarbush i in., 1996; Kawakami i wsp., 2011; Signorini i in., 2012). Obecnie uważa się również, że zastosowanie probiotyków może poprawiać funkcjonowanie układu immunologicznego cieląt (Kawakami i in., 2010; Qadis i in., 2014; Osorio, 2020). Ostatnie najnowsze badania przeprowadzone u kobiet i u gryzoni sugerują, że probiotyki zastosowane u ciężarnych matek, mogą wpływać stymulująco na

rozwój i funkcjonowanie komórek układu immunologicznego płodów a następnie noworodków (Nyangahu i Jaspán, 2019; Nyangahu i in., 2018). Nie wiadomo czy podobny wpływ można wykazać również w przypadku krów i pochodzących od nich cieląt.

1.3. Strategie poprawy odporności u krów.

Wprowadzanie coraz nowszych i wydajniejszych dodatków żywieniowych oraz ciągłe dostosowywanie ilości i składu dawki żywieniowej, obserwowane obecnie w hodowlach bydła mlecznego jest niezbędne zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, jednak czy nie jest to przecenianie. Czy nie należy również zwrócić uwagi, na jakość, strawność i strukturę pasz oraz na podstawowe potrzeby przeżuwaczy w zakresie fizjologicznych aspektów trawienia w przedżołądkach. Nieznane są w chwili obecnej skuteczne strategie mające na celu poprawę mechanizmów obronnych i jednocześnie zdrowia i dobrostanu krów w samym okresie okołoporodowym, ale również w innych okresach laktacji (Aleri i wsp., 2016). Poszukiwano rozwiązań, które poprzez wpływ na proces rozkładu dawki żywieniowej w przewodzie pokarmowym, mogłyby poprawiać strawność a nawet przyswajalność poszczególnych jej składników (Aleri i in., 2016). W ostatnim czasie zwraca się uwagę na zastosowanie probiotyków w celu poprawy wydajności, ale również zdrowotności krów. Definicja „probiotyków” na przestrzeni lat zmieniała się i obecnie, zgodnie z FAO oraz WHO (2001), są to żywe komórki mikroorganizmów, które podane w odpowiednich ilościach korzystnie wpływają na zdrowie gospodarza (Marchwińska, 2016). Drobnoustroje te podawane są w formie pojedynczych lub mieszanych kultur bakteryjnych, wpływając pozytywnie na równowagę mikrobioty zasiedlającej przewód pokarmowy konsumenta. Idea probiozy zyskała w ostatnich latach wielu zwolenników, co można zaobserwować poprzez szerokie spektrum zastosowania probiotyków w medycynie i weterynarii (Cho in., 2011; Grover i in., 2012). Preparaty probiotyczne wykorzystywane w suplementacji ludzi i zwierząt stanowią czyste kultury jednego lub większej ilości szczepów drobnoustrojów, pochodzących głównie z ich przewodów pokarmowych. Szczepy mikroorganizmów probiotycznych w obrębie jednego gatunku może cechować zróżnicowane oddziaływanie, funkcje jak i aktywność enzymatyczna. Do grupy mikroorganizmów probiotycznych zaliczane są głównie zróżnicowane morfologicznie bakterie - niewytwarzające spor, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., oraz sporulujące m.in. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* (Alexopoulos i in., 2004; Ahmed i in., 2014). A także grzyby, drożdże m.in. *Candida pintolopesii*, *Saccharomyces boulardi*, *Saccharomyces cerevisiae* (Daskiran i in., 2012; Bai i

in., 2013) oraz grzyby strzępkowe: m.in. *Aspergillus oryzae*, (Daskiran i in., 2012; Shim i in., 2012).

W ostatnich latach prowadzono wiele badań nad prozdrowotnym wpływem drobnoustrojów na organizmy. Możliwości zastosowania mikroorganizmów probiotycznych w hodowli zwierząt spotykają się z coraz większym zainteresowaniem. Wraz z odchodzeniem od profilaktycznego stosowania antybiotykoterapii u zwierząt gospodarskich coraz częściej probiotyki opisywane są jako alternatywa dla antybiotyków. Wszelkie działania mające na celu zachowanie zdrowia i dobrostanu zwierząt pośrednio są stosowane, aby chronić życie i zdrowie człowieka. Stan zdrowia zwierząt gospodarskich przekłada się bezpośrednio na jakość i bezpieczeństwo żywności pochodzenia zwierzęcego. Z tego względu dobrostan zwierząt hodowlanych oraz zapewnienie konsumentom bezpiecznej żywności jest jednym z najważniejszych elementów uwzględnianych w ramach polityki Unii Europejskiej (UE). Czynniki niepożądane w łańcuchu produkcji żywności, stanowiącymi ryzyko dla zdrowia i życia ludzi oraz zwierząt, jako główne zagrożenia wymienia się mikroorganizmy chorobotwórcze i ich metabolity (European Commission, 2012). Problem ten podkreślają raporty Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), wskazujące, że do najważniejszych źródeł zakażeń patogenami takimi jak *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* czy *Campylobacter sp.*, należą zwykle surowce i produkty pochodzenia zwierzęcego (EFSA, 2010, 2011a, 2011b; Buncic i Sofos, 2012; Romero-Barrios i in., 2013). W celu ograniczenia skażenia mięsa i innych surowców przez patogeny lub ich produkty już na etapie hodowli zwierząt stosowane są antybiotyki, które ograniczają rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych i powstrzymują wystąpienie chorób. Ponadto wiele antybiotyków może przyspieszać wzrost zwierząt i są uważane za stymulatory wzrostu, dlatego też hodowcy nadużywali preparatów zawierających wymienione substancje, w celu skrócenia cyklu produkcyjnego i zwiększenia opłacalności swoich hodowli (Marchwińska, 2016; Wegener, 2003). Niestety, niewłaściwe stosowanie antybiotyków w hodowli zwierzęcej przyczyniło się do powstania i rozprzestrzenienia zjawiska antybiotykooporności mikroorganizmów (Barton, 2000; Mathur i Singh, 2005; Clementi i Aquilanti, 2011), jak również przedostawania się pozostałości antybiotyków do żywności i surowców pochodzenia zwierzęcego (Donoghue, 2003). Z tego powodu 1 stycznia 2006 roku w krajach Unii Europejskiej wprowadzono zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu. Zakaz ten wiąże się jednak ze stratami dla hodowców i wyższymi cenami surowców mięsnych. Powstała, zatem pilna potrzeba znalezienia alternatywnych, równie efektywnych, lecz bezpiecznych dodatków paszowych,

mających na celu zapobieganie kolonizacji przewodu pokarmowego przez bakterie chorobotwórcze. Taką alternatywą mogą być preparaty zawierające bakterie probiotyczne, które podane w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza (Marchwińska, 2016).

1.4. Probiotyki w żywieniu zwierząt

Ze względu na swoje prozdrowotne oddziaływanie, na przestrzeni ostatnich lat, probiotyki coraz częściej stosowane są, jako suplementy w żywieniu zwierząt hodowlanych takich jak: krowy, owce, świnie, drób, konie, u zwierząt domowych - psów i kotów, jak również w hodowlach ryb, krewetek, zwierząt futerkowych, a nawet u pszczół. Drobnoustroje probiotyczne mogą być stosowane do dodatków paszowych w różnych postaciach: sproszkowanej, płynnej, past, kapsułek czy też granulatu. Ponadto wchodzi w skład mieszanek zakiszających pasze dla zwierząt (Nowak i in., 2010). Mogą one zawierać jeden lub kilka szczepów mikroorganizmów i być podawane w formie dodatków mikrobiologicznych, pojedynczych lub zmieszanych z innymi substancjami (Schrezenmeir i de Vrese, 2001).

Sposób, w jaki preparaty probiotyczne oddziałują na organizm zwierząt jest bardzo złożony i zależy przede wszystkim od rodzaju oraz właściwości drobnoustrojów wchodzących w ich skład. Główny mechanizm działania probiotyków opiera się na modyfikacji składu mikrobioty jelitowej (Marchwińska, 2016). Warunkiem prawidłowo funkcjonującego układu pokarmowego jest odpowiedni skład mikroorganizmów, determinowany przez czynniki takie jak wiek, stan zdrowia, sposób żywienia, cechy osobnicze, stres czy podatność organizmu na infekcje. Zdrowe ssaki w swych przewodach pokarmowych zawierają przeważającą ilość mikroorganizmów korzystnie oddziałujących na zdrowie gospodarza. W zależności od odcinka przewodu pokarmowego liczba i skład mikrobioty znacznie się różni. W żołądku, zwierząt monogastrycznych ze względu na niskie pH środowiska, ilość bytujących drobnoustrojów jest ograniczona. U przeżuwaczy natomiast główne fermentacyjne procesy rozkładu pokarmu zachodzą w żwaczu. Ponieważ jego pH 6,5 – 7,2 pozwala na bytowanie ogromnej liczby mikroorganizmów tj. ok. 60 miliardów bakterii/1 cm³ treści, i ok. 0,5 do 3 milionów pierwotniaków/1 cm³ treści żwacza (Marchwińska, 2016). Z kolei skład mikrobiologiczny treści żwacza, jest uzależniony od składu dawki pokarmowej spożywanej przez krowy i jednoznacznie wskazuje na to, że prawidłowość procesów trawiennych zachodzących w żwaczu zależy przede wszystkim od obecnej w nim mikrobioty. Najliczniej skolonizowanym odcinkiem układu pokarmowego

ssaków jest jelito grube, które stanowi siedlisko ok 1 biliona drobnoustrojów/ 1cm³, głównie bakterii beztlenowych. Jelita stanowią środowisko bytowania ok. 400-500 gatunków mikroorganizmów (Marchwińska, 2016; Tuohy i in., 2005). Probiotyki przyczyniają się do stabilizacji równowagi populacji mikroorganizmów oraz aktywności enzymatycznej w przewodzie pokarmowym, przez co wywierają dodatni wpływ na wzrost, rozwój i produktywność zwierząt. Są to naturalne szczepy bakterii jelit charakterystyczne dla przewodu pokarmowego danego gatunku zwierząt, które po doustnym wprowadzeniu zasiedlają przewód pokarmowy, uniemożliwiając tym samym nadmierny rozwój mikroorganizmów chorobotwórczych, zapewniając lepsze trawienie i optymalne wykorzystanie pokarmu (Bomba i in., 2002; Marchwińska, 2016; Saulnier i in., 2009). Udział zrównoważonej mikrobioty przewodu pokarmowego zwierząt w procesach trawienia i wchłaniania składników pokarmowych jest gwarancją prawidłowego rozwoju i szybkiego wzrostu organizmu. W zależności od składu spożywanego pokarmu, zakażeń bakteryjnych i wirusowych, jak również od aktualnie przyjmowanych leków głównie antybiotyków, skład jakościowy i ilościowy mikrobiomu przewodu pokarmowego może ulegać zmianom (Ley i in., 2008; Marchwińska, 2016). Zachwianie lub zniszczenie endogennej bariery mikrobiologicznej przewodu pokarmowego doprowadza do jego zasiedlenia przez drobnoustroje patogenne. Dochodzi wówczas do zaburzenia w funkcjonowaniu samego przewodu pokarmowego, a nawet uszkodzenia błony śluzowej, co stanowi zagrożenie dla zdrowia zwierzęcia, ponieważ umożliwia przenikanie bakterii chorobotwórczych lub ich toksyn do krwi (Marchwińska, 2016; Trafalska i Grzybowska, 2004).

Probiotyki mogą wpłynąć na zmianę ilości i jakości drobnoustrojów w układzie pokarmowym regulując liczebność mikrobioty korzystnej i szkodliwej dla organizmu (Mountzouris i in., 2007; An i in., 2008). Wpływ na zmiany składu populacji w mikrobiomie przewodu pokarmowego zwierząt ma określona aktywność biologiczna wprowadzanych drobnoustrojów probiotycznych. Wiąże się to m.in. z wytwarzaniem przez nie substancji przeciwdrobnoustrojowych, takich jak kwasy organiczne czy bakteriocyny (Shim i in., 2012). Wytwarzane przez te drobnoustroje kwas mlekowy i octowy obniżają pH środowiska przez co mają działanie hamujące na rozwój patogenów (Commane i in., 2005; Daşkiran i in., 2012). Bakteriocyny i inne metabolity przeciwdrobnoustrojowe, jak nadtlenek wodoru, również wpływają hamująco na wzrost mikroorganizmów niepożądanych. Ponadto probiotyki mogą ograniczać kolonizację jelit przez patogeny dzięki swojej zdolności adhezji do nabłonka jelitowego (Jin i in., 1996; Mookiah i in., 2014). Dzięki takiej aktywności, obserwuje się np.

skrócenie czasu rekonwalescencji po przebyciu chorób czy też zmniejszenie skutków ubocznych w przypadku antybiotykoterapii. Ponadto, dane literaturowe wskazują również na możliwość nieswoistej stymulacji układu odpornościowego zwierząt, co stanowi kolejny korzystny efekt stosowania mikroorganizmów probiotycznych (Marchwińska, 2016; Schrezenmeir i de Vrese, 2001). W ostatnich latach w badaniach nad funkcjonalnymi właściwościami bakterii probiotycznych wykazano ich przeciwnowotworowe oddziaływanie. Jest to związane z konkurencją w obrębie mikrobiomu przewodu pokarmowego zwierząt i ograniczeniem rozwoju bakterii produkujących enzymy fekalne o działaniu prokancerogennym (Marchwińska, 2016; Kumar i in., 2015). Pomimo, iż większość mechanizmów działania probiotyków na organizm zwierząt nie została jeszcze w pełni poznana, wymienia się wiele korzyści związanych z ich stosowaniem. Prawidłowy skład populacji bakterii w przewodzie pokarmowym, wspomagany stosowaniem probiotyków, jest często związany ze zwiększoną wydajnością zwierząt, wpływając na bardziej efektywne trawienie i wzrost odporności (Marchwińska, 2016; Niba i in., 2009).

U przeżuwaczy stosuje się probiotyki zarówno u krów mlecznych, jak i u bydła opasowego. Przyczyniają się one m.in. do poprawy mleczności i jakości mleka, stabilizacji równowagi mikrobiologicznej w żwaczu oraz lepszego wykorzystania składników paszy. Są postrzegane jako dodatki nie ingerujące negatywnie w środowisko naturalne, a wręcz je chroniące poprzez ograniczanie wydalania związków azotowych przez zwierzęta oraz bezpieczne dla zdrowia konsumenta (Saulnier i in., 2009). Mechanizm działania mikroorganizmów probiotycznych wprowadzonych do przewodu pokarmowego u krów mlecznych dotyczy głównie współzawodnictwa o przyleganie na nabłonku jelit i o składniki pokarmowe, produkcji substancji bakteriostatycznych, inhibitujących rozwój patogenów oraz stymulowania odporności organizmu (Oelschlaeger, 2010; Wan i in., 2018). Dokładny mechanizm działania immunomodulacyjnego probiotyków nie został poznany. U ludzi i myszy wykazano, że kompleksy pełnych komórek bakterii probiotycznych lub ich fragmentów z komórkami tkanki limfatycznej przewodu pokarmowego (GALT) oddziałują modulując na funkcje limfocytów T i B wyzwalając odpowiedź immunologiczną na antygeny. Probiotyki pobudzają także komórki immunokompetentne do produkcji cytokin odpowiedzialnych za nasilenie, supresję lub regulację ogólnej i miejscowej odpowiedzi immunologicznej (Maldonado i in., 2019). Nie jest w pełni poznany dotychczas, wpływ podawania probiotyków na funkcję układu immunologicznego u krów mlecznych, większość publikacji, głównie przeglądowych jedynie potwierdza, że probiotyki działają stymulująco na

odporność u krów (Deng i in., 2015; Uyeno i in., 2015). Nie wiadomo również czy zastosowanie preparatów probiotycznych u krów w ostatnim trymestrze ciąży, może mieć pozytywny (stymulujący) wpływ na układ immunologiczny u nowonarodzonych cieląt.

2. Cel badań

Biorąc pod uwagę powyższe informacje oraz niepoznany dotychczas wpływ i sposób działania probiotyków na układ immunologiczny dorosłych krów i cieląt, celem przeprowadzonych badań było:

- 1) Ocena wpływu probiotyków stosowanych w postaci dodatków do żywienia, na wybrane wskaźniki odporności komórkowej u krów mlecznych.
- 2) Określenie czy zastosowanie probiotyków w żywieniu krów mlecznych ma uzasadnienie w różnych okresach laktacji, czy wystarczy ich stosowanie w ograniczonym czasie np. w okresie przejściowym.
- 3) Ocena wpływu probiotyków stosowanych u ciężarnych krów przez 6 ostatnich tygodni ciąży (cały okres zasuszenia), na wybrane parametry odporności komórkowej u urodzonych przez nie cieląt.
- 4) Ocena wpływu probiotyków podawanych cielętom od 3 do 120 dnia po ich urodzeniu, na wybrane wskaźniki odporności komórkowej u tych cieląt.

3. Materiał i metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne.

Badania przeprowadzono w stadzie liczącym 60 mlecznych krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, które były w różnych okresach laktacji. Krowy utrzymywane były w systemie wolno wybiegowym, a żywienie opierało się na systemie Total Mixed Ration (TMR). Dzięki tej metodzie w rezultacie uzyskiwano całkowicie wymieszaną karmę o kompletnym składzie odżywczym dostosowanym do wymagań fizjologicznych krów. A skład karmy w gospodarstwie objętym badaniami był zrównoważony dla krów w okresie laktacji ze średnią produkcją mleka około 24 kg. Ponadto każda krowa o wydajności mlecznej przekraczającej 24 kg otrzymała dodatkowy 1 kg karmy na każde 2 kg mleka wyprodukowanego dodatkowo. Dawka żywieniowa u krów w okresie laktacji obejmowała: kiszonkę kukurydzianą, sianokiszonkę, zakiszone ziarno browarniane, słomę pszenną, zakiszone ziarno kukurydzy, zmielone ziarno jęczmienia, zmielone ziarno pszenżyta, śrutę rzepakową poekstrakcyjną, śrutę sojową poekstrakcyjną, glicerynę, mieszaninę mineralno - witaminową, wodorowęglan sodu i węglan wapnia. Dodatkowo dla krów zasuszonych w okresie 6-7 tygodni przed spodziewanym terminem porodu stosowano dodatek paszowy (mineralno – witaminowy) Prela HP (SANO) zawierający w swoim składzie 34% białka surowego (w tym 5% azotu niebiałkowego - NPN); 6,5% włókna surowego; 2,5% oleju i tłuszczu surowego; 18% popiołu surowego; 5% skrobi; 6% węglowodanów; 3,4 % wapnia; 0,95% fosforanu; 1% sodu; 1,6 % magnezu; 0,9% siarki. Ponadto preparat zawierał: witaminy A, D3, E, B1, B2, B6, B12, kwas nikotynowy, kwas pantotenowy i biotynę oraz mikroelementy takie jak: Zn, Mn, Cu, Co, Se. Całkowita zawartość energii w preparacie wynosiła 6,2 MJ energii NEL (DLG). Dokładny skład TMR w przeliczeniu na jedną krowę, został podany w tabeli 1. Wydajność mleczna krów w 305-dniowym okresie laktacji wynosiła od 7,200 do 8,720 kg na krowę. Odżywianie krów dostosowano do rzeczywistej wydajności mleka i okresu ciąży, dlatego skład podanej wyżej dawki pokarmowej zmieniał się w zależności od okresu laktacji krów. Kontrola układu rozrodczego polegająca na badaniu rektalnym w połączeniu z ultrasonografią przeprowadzano regularnie, co miesiąc. U krów, które nie miały powikłań podczas porodu i nie wystąpiły objawy stanu zapalnego w układzie rozrodczym, zastosowano protokół synchronizacji rui i owulacji (protokół presynch-ovsynch) oraz sztuczne zapłodnienie (AI) mrożonym nasieniem. Krowy z wykrytym zapaleniem macicy były odpowiednio leczone, a następnie poddane protokołowi synchronizacji rui i owulacji oraz AI. Krowy z zaburzeniami cyklu jajnikowego leczono indywidualnie zgodnie z rozpoznaną przyczyną.

Doświadczenie zostało podzielone na dwa etapy. Pierwszy przeprowadzono u dorosłych krów a drugi u cieląt pochodzących od wybranych do badań krów. Do właściwych badań w pierwszym etapie, wytypowano 20 ciężarnych krów. Wszystkie krowy były w końcowym okresie laktacji, przed zasuszeniem. Krowy były w dobrej kondycji (Body Condition Score 3.0-3.5) w pięciostopniowej skali (Roche et al., 2009). Badania wstępne obejmowały ocenę ogólnego stanu zdrowia zwierząt, na podstawie badania klinicznego, które potwierdziły, że wszystkie krowy wytypowane do doświadczenia były klinicznie zdrowe. Ponadto u wszystkich wybranych krów dla potwierdzenia ogólnego stanu zdrowia, przeprowadzono standardowe badania hematologiczne (WBC, RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, trombocyty, granulocyty, limfocyty), badania wykonano w automatycznym analizatorze hematologicznym „Sci Vet abc Plus” (Horiba Medical, Montpellier, France), wyniki tych badań były u wszystkich wytypowanych krów w granicach norm fizjologicznych (Winnicka 2021), a ich wyniki zamieszczono w tabeli nr. 2. Wytypowane zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy (każda po 10 krów) w zależności od tego czy stosowano w dawce żywieniowej probiotyk czy nie. Grupę doświadczalną stanowiły krowy, u których stosowano preparat probiotyczny (EM-Probiotyk, Greenland Technology EM, Trzcianki, Poland, która jest przedstawicielem Japońskiej firmy EMRO, Okinawa, Japan). Produkt zawierał w swoim składzie w 1ml *Saccharomyces cerevisiae* 5×10^3 CFU, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus plantarum* 5×10^6 CFU oraz *Rhodopseudomonas palustris* i melasę trzcinową - jedynie jako walor smakowy. Preparat podawano w formie płynnej, jako dodatek do standardowej karmy, w dawce zalecanej przez producenta (200 ml preparatu, na 1 krowę dziennie), przez okres od wytypowania krów przed zasuszeniem, do 12 tygodnia po porodzie (90 DPP). Probiotyk podawano poprzez polanie preparatem probiotycznym karmy przeznaczonej dla każdej krowy oddzielnie. Przepuszczalnie w związku z walorami smakowymi, probiotyk zawsze był chętnie zjadany przez krowy, jako pierwszy a następnie przeznaczona dawka pokarmowa, dlatego podanie probiotyku krowom nie stanowiło żadnego problemu. Grupę kontrolną stanowiły krowy, u których przez okres trwania badań nie stosowano żadnych preparatów leczniczych, jedynie pobierano materiał do badań, krowy te były żywione identycznie jak grupa badawcza jednak bez dodatku probiotyku. Krowy obu grup poddane zostały takiej samej procedurze badawczej.

W drugim etapie doświadczenia badaniem objęto 20 cieląt pochodzących od krów z grupy doświadczalnej i kontrolnej. Cielęta bezpośrednio po porodzie były odpajane siarą, a następnie przez kolejne 5 dni były karmione mlekiem matki. Po tym czasie przechodzono na

karmienie preparatem mleko zastępczym, który stosowano przez okres 8 tygodni. Dodatkowo w 4 tygodniu życia do żywienia wprowadzono pełnoporcjową mieszankę Kalbi TMR Alfa 8076, o następującej zawartości składników: białko surowe 18,15%; tłuszcz surowy 2,50%, włókno surowe 7,10%; popiół surowy 8,35; wapń 1,30%; fosfor 0,50%; sól 0,35%; magnez 0,25%, witaminy A, D3, E, mikroelementy: Fe, Co, Cu, Zn, Mn, J, Se. Cielęta zostały podzielone również na dwie grupy po 10 sztuk w każdej, identycznie jak krowy, grupa doświadczalna i kontrolna. Grupę doświadczalną stanowiły cielęta pochodzące od krów grupy doświadczalnej, natomiast cielęta pochodzące od krów grupy kontrolnej również stanowiły grupę kontrolną. Cielęta grupy doświadczalnej otrzymywały od 3 dnia życia preparat probiotyczny (EM-Probiotyk, Greenland Technology EM, Trzcianki, Poland), w ilości pierwszy miesiąc 100 ml/sztukę a następnie 50 ml/sztukę do końca trwania doświadczenia. Preparat podawano doustnie, początkowo do picia w mleku a następnie w preparacie mleko zastępczym a później, jako dodatek do spożywanego pokarmu. Preparat ten podawany był cielętom przez cały okres trwania doświadczenia tj. do 120 dnia od urodzenia się cieląt. Cielęta grupy kontrolnej były żywione w ten sam sposób jak cielęta grupy doświadczalnej, jednak bez dodatku probiotyku.

Tabela 1. Skład TMR i SM (sucha masa), dzienna dawka pokarmowa dla krów w okresie laktacji.

Składnik paszy	Dawka dla jednej krowy, dziennie	
	kg	kg SM
Kiszonka z kukurydzy	25.0	8.8
Sianokiszonka	8.0	3.2
Młóto browarniane kiszone	8.0	2.7
Słoma pszenna	0.8	0.7
Kiszone ziarno kukurydzy	2.5	1.7
Śruta jęczmienna	1.5	1.3
Śruta z pszenżyta	1.5	1.3
Śruta rzepakowa poekstrakcyjna	2.7	2.2
Śruta sojowa poekstrakcyjna	2.0	1.7
Gliceryna	0.3	0.24
Mieszanka mineralno-witaminowa	0.2	0.18
Kwaśny węglan sodu	0.2	0.2
Kreda pastewna	0.05	0.05
Razem	52.73	24.27

Tabela 2. Wartości średnie \pm odchylenie standardowe ocenianych parametrów hematologicznych krów w grupie doświadczalnej (D) i grupie kontrolnej (K).

Oceniany parametr	Grupa	
	D	K
Leukocyty [x 10 ⁹ /L]	10,12 \pm 0,94	9,88 \pm 2,11
Erytrocyty [x 10 ¹² /L]	7,44 \pm 0,46	7,064 \pm 0,95
Hemoglobina [g/dL]	11,42 \pm 0,87	11,74 \pm 1,35
Hematokryt [%]	34,96 \pm 2,95	33,28 \pm 4,23
MCV [SOK] [fl]	47 \pm 3,46	47,2 \pm 1,48
MCH [SMH] [pg]	15,34 \pm 0,99	16,7 \pm 0,87
MCHC [SSH] [g/dL]	32,64 \pm 0,59	35,34 \pm 1,37
Trombocyty [x 10 ⁹ /L]	547,2 \pm 83,40	545,8 \pm 75,85
Neutrofile pałeczkowate [x 10 ⁹ /L]	0,40 \pm 0,08	0,12 \pm 0,04
Neutrofile segmentowane [x 10 ⁹ /L]	4,03 \pm 0,57	3,93 \pm 1,01
Granulocyty kwasochłonne [x 10 ⁹ /L]	0,72 \pm 0,65	0,82 \pm 0,56
Limfocyty [x 10 ⁹ /L]	4,99 \pm 0,27	5,00 \pm 1,03

3.2. Materiał

Materiał do właściwych badań zarówno u krów, jak i pochodzących od nich cieląt, stanowiła krew obwodowa. Materiał do badań od krów, pozyskiwano sześciokrotnie, pierwszy raz, w dniu wytypowania zwierząt - przed zasuszeniem, a następnie 10 dni przed porodem, 7 dni po porodzie, 21 dni po porodzie, 60 dni po porodzie oraz 90 dni po porodzie. U cieląt natomiast krew pobierano 48 godzin po urodzeniu, 21, 60 i 120 dni po urodzeniu cieląt. Krew zarówno u krów jak i u cieląt pobierano w ilości 9 ml z żyły szyjnej zewnętrznej do standardowych próbek bez dodatków, z EDTA oraz próbek heparynizowanych (Vacutest Kima srl, Arzergrande (PD), Italy). W ciągu godziny, pozyskany materiał biologiczny został przewieziony do laboratorium, w celu przeprowadzenia odpowiednich

badania. Do badań cytometrycznych została wykorzystana pełna krew, natomiast ocenę poziomu SAA wykonano w surowicy krwi, w tym celu krew pobrana do probówek bez dodatków została odwirowana przy 2500 x g przez 10 minut w 4°C, a surowicę zebrano i przeniesiono do 2-ml probówek i przechowywano w -80°C do czasu analizy.

3.3. Metody badawcze

3.3.1. Ocena aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów.

Do oceny aktywności fagocytarnej użyto heparynizowanej krwi, pobranej do standardowych probówek zawierających heparynę (Vacutest Kima srl, Arzergrande (PD), Włochy). Aktywność fagocytarną granulocytów i monocytów określono przy użyciu komercyjnego zestawu Phagotest (Orpegen Pharma, Heidelberg, Niemcy). Testy przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta. Oceniono procent granulocytów i monocytów, które pochłonęły bakterie. Oceniono średnią intensywność fluorescencji (SIF) populacji komórek fagocytujących, aby oszacować indywidualną aktywność fagocytarną komórek (liczba bakterii na komórkę). Zestaw Phagotest (Orpegen Pharma, Heidelberg, Niemcy) zawiera opsonizowane *Escherichia coli* znakowane fluoresceiną (*E. coli* - FITC). Próbkę 100 µl krwi z heparyną chłodzono w łaźni lodowej przez 15 min. następnie zmieszano z 2×10^7 *E. coli* znakowanych FITC, po czym umieszczano w termostacie komorowym w 37°C przez 10 min. Jednocześnie próbki kontrolne umieszczono w łaźni lodowej w celu zahamowania fagocytozy. Następnie dodano 100 µl błękitu brylantowego (roztwór gaszenia) w celu stłumienia fluorescencji bakterii związanych z powierzchnią leukocytów. Po dwóch etapach płukania (z 2 ml roztworu do płukania, odwirowywany przy 2000 obr/min, supernatant odpompowywano), erytrocyty poddano lizie przy użyciu płynu do lizy przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Na koniec dodano 50 µl jodku propidyny, aby wykluczyć artefakty agregacji bakterii lub komórek (zabarwienie leukocytów i bakteryjnego DNA). Testy przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta i zgodnie z danymi literaturowymi (Panasiuk i in., 2005).

3.3.2. Ocena wewnątrzkomórkowej bójczości komórek fagocytujących.

Wybuch tlenowy neutrofilii określono ilościowo za pomocą zestawu Bursttest Kit (Orpegen Pharma, Heidelberg, Niemcy). Świeżą heparynizowaną krew umieszczono w łaźni wodnej na 15 min. Następnie cztery probówki napełniono 100 µl krwi każda i 2×10^7 nieznakowanych opsonizowanych bakterii *E. coli*, 20 µl roztworu substratu (kontrola

negatywna), 20 μ l fMLP (peptyd N-formyl-MetLeuPhe), jako chemotaktyczny niski fizjologiczny bodziec (niska kontrola) i 20 μ l 12-mirystynianu 13-octanu forbolu (PMA), silny aktywator niereceptorowy (wysoka kontrola). Wszystkie próbki inkubowano przez 10 min w 37,0 °C w łaźni wodnej, dodano dihydrorodaminę (DHR) 123 jako substrat fluorogenny i inkubowano ponownie w tych samych warunkach. Wybuch oksydacyjny nastąpił podczas wytwarzania reaktywnych substratów tlenowych (ROS) (anion nadtlenny, nadtlenek wodoru) w granulocytach stymulowanych *in vitro*. W granulocytach stymulowanych ROS niefluorescencyjna DHR 123 uległa konwersji do fluorescencyjnej rodaminy (R) 123 zarejestrowanej w cytometrze przepływowym. Erytrocyty usunięto stosując roztwór do lizy, przez 20 min. w temperaturze pokojowej, odwirowano (5 min, 250 obr/min, 4°C) i supernatant odrzucono. Próbkę ponownie przemyto (roztwór do płukania), odwirowano (5 min, 250 obr/min, 4°C) i supernatant zdekantowano. Dodano ilość 200 μ l roztworu barwiącego DNA (odwirowanego i inkubowanego przez 10 min w 0 °C w ciemnym miejscu) w celu odróżnienia i wykluczenia artefaktów agregacji bakterii i/lub komórek w analizie przepływowej cytometrii. Testy przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta oraz zgodnie z danymi literaturowymi (Panasiuk i in., 2005).

3.3.3. Analiza cytometryczna

Do badań cytometrycznych został wykorzystany, cytometr przepływowy EPICS XL (Beckman Coulter Ltd., Floryda, USA) wyposażony w laser argonowo-jonowy 488 nm. Aparat był kalibrowany codziennie przy użyciu Flow-Check Fluorospheres (Beckman Coulter Ltd., Floryda, USA). Populacje neutrofilii identyfikowano za pomocą rozpraszania światła do przodu i pod kątem prostym. Pomiary fluorescencyjne przeprowadzono z identycznymi ustawieniami, jak w przypadku standardowego oznaczania fenotypu komórki za pomocą mAb barwionego fluorochromem. Aktywność fagocytarną określono, jako procent fagocytujących neutrofilii i monocytów/makrofagów (połknięcie jednej lub więcej bakterii) oraz jako wartość średniej intensywności fluorescencji (SIF), która była równa średniej liczbie bakterii fagocytowanych przez komórki. Metabolizm tlenowy granulocytów obojętnochłonnych określano procentem komórek fagocytujących *E. coli* produkujących reaktywne utleniacze (komórki ulegające rozerwaniu, zmiana z DHR 123 na R 123) oraz oceną aktywności enzymatycznej granulocytów obojętnochłonnych (ilość uwalnianych związków aktywnego tlenu – ilość SIF R 123 na ogniwo).

3.3.4. Fenotypowanie leukocytów metodą cytometrii przepływowej

Analizę cytometryczną przeprowadzono w ciągu 4 godzin od pobrania próbki. Immunofenotypowanie limfocytów przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego Epics XL (Beckman Coulter, Floryda, USA). Codzienną kalibrację przeprowadzano przy użyciu kulek fluorescencyjnych Flow Check (Beckman Coulter, Floryda, USA). Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej badano następujące receptory: CD4 (komórki pomocnicze T (Th), CD8 (komórki T cytotoksyczne/supresorowe), CD11b (podjednostka receptora integryny α M), CD18 (podjednostka receptora integryny β 2), CD21 (limfocyty B), CD25 (łańcuch alfa receptora interleukiny 2) i Foxp3 (komórki T-regulatorowe). Wszystkie przeciwciała zakupiono w firmie Serotec (Serotec Immunological Excellence, Oxford, Anglia). We wszystkich testach zastosowano sprzężone przeciwciała pierwszorzędowe z wyjątkiem CD18, gdzie zastosowano znakowanie pośrednie. Reaktywność krzyżowa przeciwciała CD18 została potwierdzona przez Brodersen i in. (1998). Szczegóły dotyczące specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych i koniugatu przeciwciał drugorzędowych użytych w tym badaniu są wymienione w Tabeli 3. Przed eksperymentem ustalono optymalne rozcieńczenia przeciwciał przez miareczkowanie. Do barwienia krwi obwodowej próbki komórek inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami przez 30 minut zgodnie z ustalonym protokołem. Erytrocyty usunięto z analizy stosując roztwór do lizy chlorku amonu. Podzbiory leukocytów bramkowano zgodnie z ich wielkością i ziarnistością przy użyciu parametrów FSC i SSC. Z każdej próbki zebrano, co najmniej dziesięć tysięcy leukocytów. W przypadku barwienia wewnątrzkomórkowego Foxp3 limfocyty barwiono najpierw przeciwciałami zewnątrzkomórkowymi (CD4, CD25 – Tabela 3). Następnie komórki krwi obwodowej utrwalano i permeabilizowano przy użyciu odczynnika permeabilizacji IntraPrep (Beckman Coulter, Floryda, USA) zgodnie z ustalonym protokołem. W następnym etapie próbki inkubowano ze znakowanym FITC anty-mysim mAb Foxp3 (klon FJK-16, eBioscience, San Diego, CA, USA) przez 30 min. Erytrocyty usunięto z analizy stosując roztwór do lizy chlorku amonu. Z każdej próbki zebrano, co najmniej trzydzieści tysięcy leukocytów. Komórki Foxp3+ bramkowano w obrębie subpopulacji limfocytów CD4+. Zastosowano odpowiednie kontrole, aby wspomóc decyzje dotyczące bramkowania. Kontrole prowadzono w dokładnie takich samych warunkach jak próbki doświadczalne. Procedury walidacji przeprowadzono przy użyciu kulek fluorescencyjnych Flow Check (Beckman Coulter, Floryda, USA) i komórek Immuno-Troll (Beckman Coulter, Floryda, USA). Wszystkie analizy przeprowadzono według tego samego, niezmiennego protokołu, tych

samych ustawień aparatury i przy tych samych zastosowanych napięciach. Dla każdego punktu poboru zastosowano dobowe procedury kompensacyjne. Wszystkie próbki badano przy „niskim” natężeniu przepływu.

Tabela 3. Lista przeciwciał pierwotnych i koniugatów wtórnych użytych w badaniach.

Antibodies, dye	cell type	Clone	Isotype
Mouse anti bovine CD4, PE	T helper (Th) cells	CC8	IgG2a
Mouse anti bovine CD8, FITC	T cytotoxic/suppressor cells	CC63	IgG2a
Mouse anti bovine CD11b, FITC	α M-integrin receptor subunit	CC126	IgG2b
Mouse anti dog CD18, PURIFIED	β 2-integrin receptor subunit	CA1.4E9	IgG1
Goat anti Mouse IgG (Fc), FITC	secondary Ab	polyclonal	polyclonal IgG
Mouse anti bovine CD21, FITC	B lymphocytes	CC21	IgG1
Mouse anti bovine CD25, RPE	Interleukin-2 receptor alpha chain	IL-A111	IgG1
Mouse anti bovine Foxp3+, FITC	T-regulatory cells	FJK-16s	IgG2a, kappa

FITC - fluorescein isothiocyanate; RPE - R-phycoerythrin; PE – phycoerythrin

3.3.5. Pomiary surowiczego amyloidu A w surowicy krwi

Ocenę stężenia surowiczego amyloidu A (SAA) w surowicy krwi przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu ELISA (Tridelta Development Ltd., Maynooth, Kildare, Irlandia). Współczynniki zmienności między testami i wewnątrz testów dla analizy SAA wynosiły odpowiednio <12,1% i <7,5%. Procedury przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producentów i metodami literaturowymi (Suojala i in., 2008; Tothova i in., 2014). Odczyty

absorbancji i późniejsze obliczenia stężeń końcowych przeprowadzono na automatycznym czytniku mikroplitek (Asys Expert Plus, Biochrom Ltd., Cambridge, Anglia) przy 450 nm, 630 nm, jako odniesienie dla SAA. Liofilizowaną surowicę ostrej fazy bydłowej zastosowano, jako standard i przeprowadzono kalibrację zgodnie z uzgodnionymi działaniami Unii Europejskiej dotyczącymi standaryzacji zwierzęcych APP (nr QLK5-CT-1999-0153).

3.4. Analiza statystyczna.

Wszystkie wartości przedstawiono, jako średnie \pm SD. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica (wersja 10.0) oraz jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA). Normalność rozkładu danych potwierdzono za pomocą nieparametrycznego testu Kołomogorowa-Smirnowa z poprawką Lilleforsa. Uzyskane wyniki porównano między grupami kontrolną i eksperymentalną w celu określenia istotności statystycznej za pomocą testu t-Studenta, dla prawdopodobieństwa $p < 0,05$. Różnice statystyczne między wynikami dla materiału zebranego w różnym czasie w grupie obliczono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testów post-hoc Tukeya i Duncana, dla prawdopodobieństwa $p < 0,01$.

4. Wyniki

4.1. Aktywność fagocytarna i wewnątrzkomórkowa bójczość komórek fagocytujących u krów doświadczalnych w przebiegu doświadczenia.

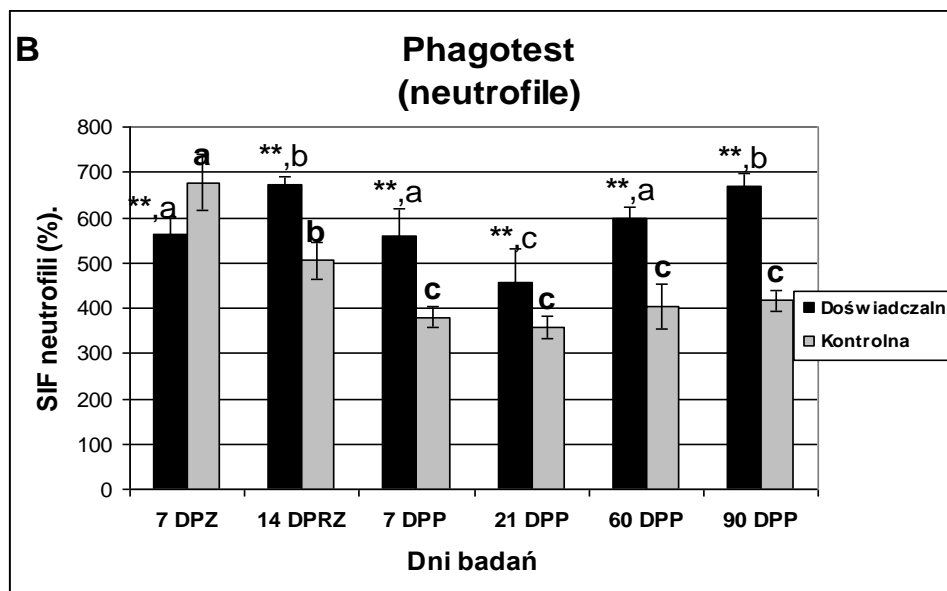
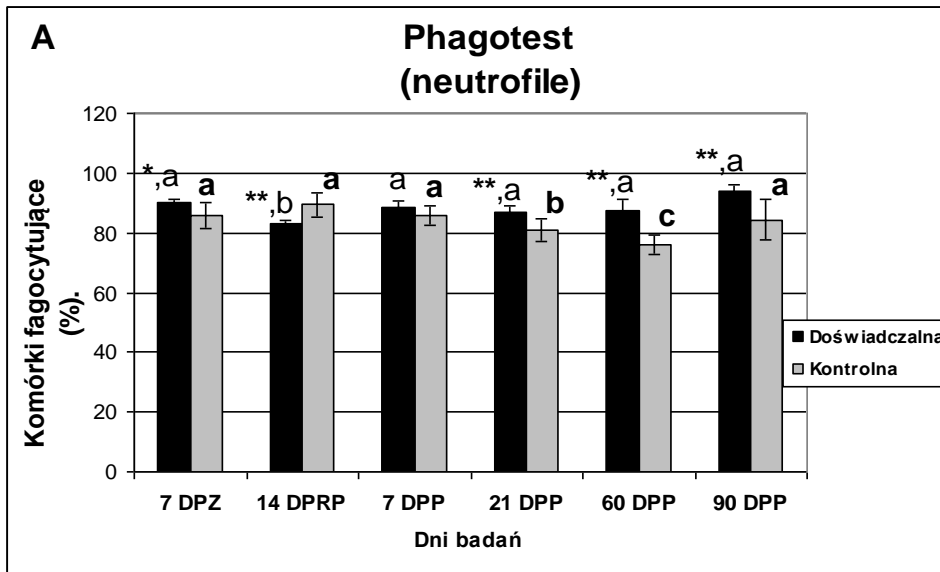
Odsetek fagocytujących neutrofilii u krów w grupie doświadczalnej jedynie w 14 dniu przed porodem (DPRP) był istotnie niższy w porównaniu do pozostałych terminów badań, była to też wartość niższa w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,001$). Natomiast istotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej, były wartości w 21, 60 i 90 dniu po porodzie (DPP) ($p < 0,001$) (Tabela 4; Figura 1A). Odsetek fagocytujących monocytów w obu grupach krów był najniższy w 21 DPP (D – 68.0 ± 3.0 ; K – 44.3 ± 5.1), w porównaniu do pozostałych terminów badań ($p < 0,01$). Wartości uzyskane w grupie doświadczalnej we wszystkich terminach badań były istotnie wyższe w porównaniu do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej ($p < 0,01$) (Figura 1C). Średnia Intensywność Fluorescencji (SIF) granulocytów i monocytów uzyskane w grupie doświadczalnej, jedynie w 7 dniu przed zasuszeniem (DPZ), były niższe w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Wartości uzyskane we wszystkich pozostałych terminach badań były wyższe w grupie doświadczalnej, porównując do grupy kontrolnej ($p < 0,001$) (Tabela 4; Figura 1B, 1D). W wewnątrzkomórkowej bójczości

(Bursttest), zarówno % komórek fagocytujących, jak i SIF neutrofilii uzyskane w grupie doświadczalnej, były wyższe we wszystkich terminach badań w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Jedynie w pierwszym terminie badań – 7 DPZ, wartości w obu grupach były podobne (Tabela 4; Figura 2A, 2B).

Tabela 4. Aktywność fagocytarna i wewnątrzkomórkowa bójczość granulocytów i monocytów w krwi krów doświadczalnych i kontrolnych w przebiegu doświadczenia.

Rodzaj badania	Grup a	7 dni przed zasuszeniem	14 dni przed porodem	7 dni po porodzie	21 dni po porodzie	60 dni po porodzie	90 dni po porodzie
% komórek fagocytujących (granulocyty)	D	90,0 ±1,2*,a	82,9 ±1,1 **,b	88,4 ±2,5 a	87,0 ±2,0**,a	87,2 ±4,0**,a	93,7 ±2,3**,a
	K	85,7 ±4,5 a	89,4 ±4,1 a	85,8 ±3,4 a	81,0 ±3,8 b	76,0 ±3,4 c	84,4 ±6,6 a
Intensywność fluorescencji (granulocyty)	D	563,1 ±37,2**,a	672,1** ±18,2 b	557,9 ±60,9**,a	458,3 ±74,2**,c	597,9 ±26,0**,a	668,3 ±28,6**,b
	K	677,6 ±60,6 a	504,6 ±41,5 b	378,9 ±23,0 c	358,7 ±24,8 c	403,3 ±50,6 c	416,1 ±23,4 c
% komórek fagocytujących (monocyty)	D	74,1 ±2,1**,a	79,6 ±3,0**, b	76,1 ±2,2**,ab	68,0 ±3,0**,c	77,4 ±3,0**,ab	79,2 ±0,6**,b
	K	55,9 ±3,1 a	61,1 ±1,9 b	54,7 ±2,8 a	44,3 ±5,1 c	57,3 ±5,8 a	58,8 ±1,8 a
Intensywność fluorescencji (monocyty)	D	412,2 ±17,1**,a	435,6 ±7,5**,b	391,6 ±27,3**,a	301,8 ±15,6**,c	409,4 ±15,2**,a	432,3 ±13,5**,b
	K	530,2 ±9,7 a	291,7 ±12,7 b	221,6 ±37,3 c	207,2 ±18,3 c	215,8 ±36,6 c	266,6 ±15,8 ab
Wewnątrzkom. bójczość granulocytów po aktywacji PMA (% kom. pobudzonych)	D	78,1 ±7,2*,a	83,3 ±7,0**,a	79,3 ±5,5**,a	65,8 ±3,1**,b	77,0 ±4,8**,a	83,0 ±2,6**,a
	K	69,1 ±6,9 a	69,8 ±5,3 a	54,2 ±5,3 b	50,9 ±6,6 b	62,5 ±7,5 a	64,4 ±8,6 a
Intensywność fluorescencji granulocytów po aktywacji PMA	D	773,2 ±51,1 a	840,5 ±52,3*,b	762,8 ±87,3**,a	865,9 ±53,9**,b	814,7 ±69,2**,a b	815,9 ±52,4**,a b
	K	768,0 ±31,0 a	490,4 ±59,6 b	324,1 ±59,6 c	457,5 ±32,4 b	483,7 ±22,8 b	490,3 ±49,0 b

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej
a - c – różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi terminami badań w danej grupie.



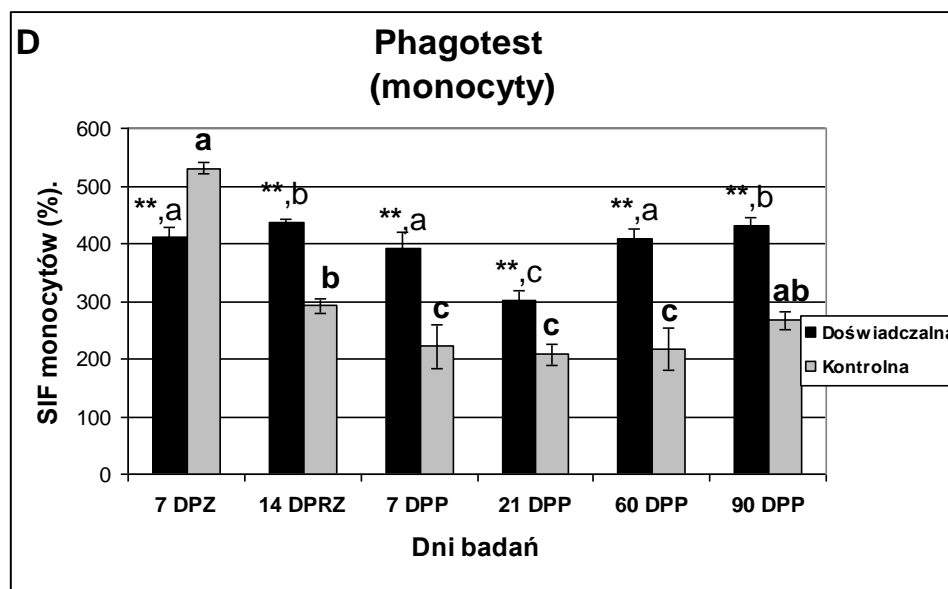
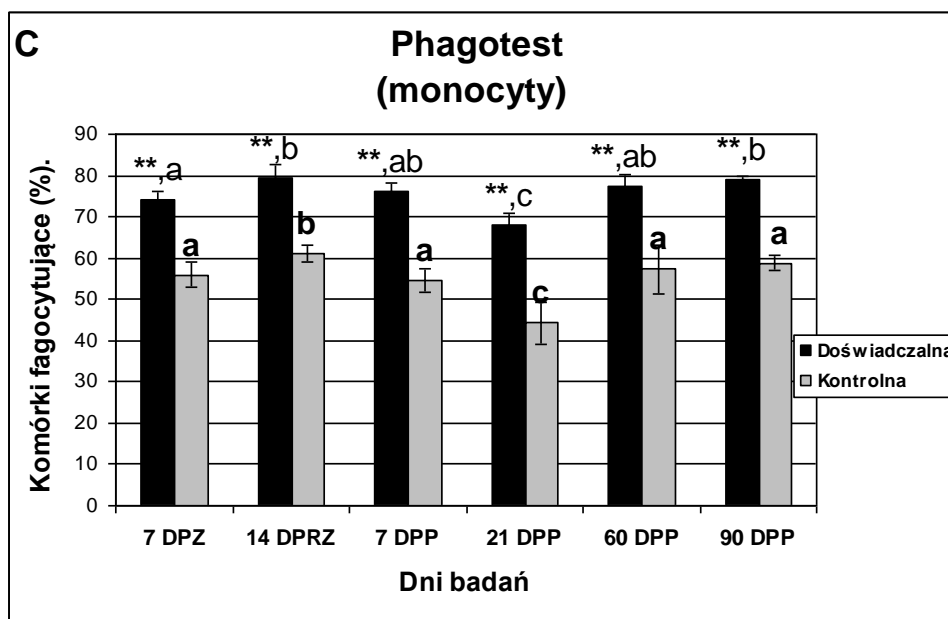


Fig. 1. Cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej neutrofilii (A, B) i monocytołów (C, D) w krwi obwodowej krów, w różnych okresach laktacji (mean±SD), DPZ – dzień przed zasuszeniem; DPRZ – dzień przed porodem; DPP – dzień po porodzie. Doświadczalna – krowy z probiotykiem (n=10); Kontrolna – krowy bez probiotyku (n=10). Komórki fagocytujujące (%) – procentowa ilość neutrofilii i monocytołów, które pochłonięły znakowane bakterie. Średnia Intensywność Fluorescencji (SIF) - Indywidualna aktywność fagocytarnej komórki fagocytujującej (ilość bakterii pochłoniętych przez jedną komórkę). Istotność statystyczna na poziomie * – $p < 0.05$ oraz ** – $p < 0.01$ w porównaniu do grupy kontrolnej. **a-c** różnice istotne statystycznie, pomiędzy wynikami uzyskanymi w różnym czasie w danej grupie, na poziomie - $p < 0.01$.

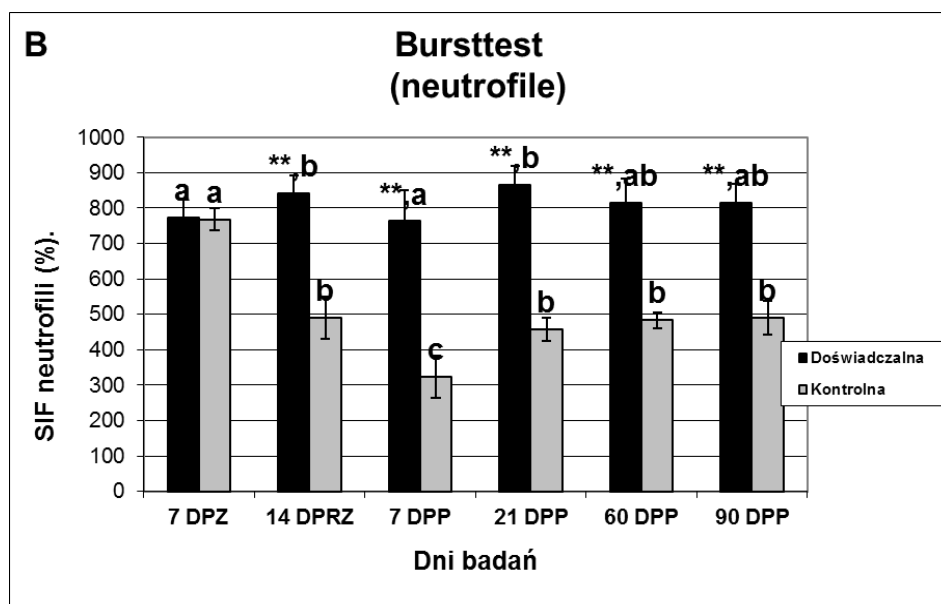
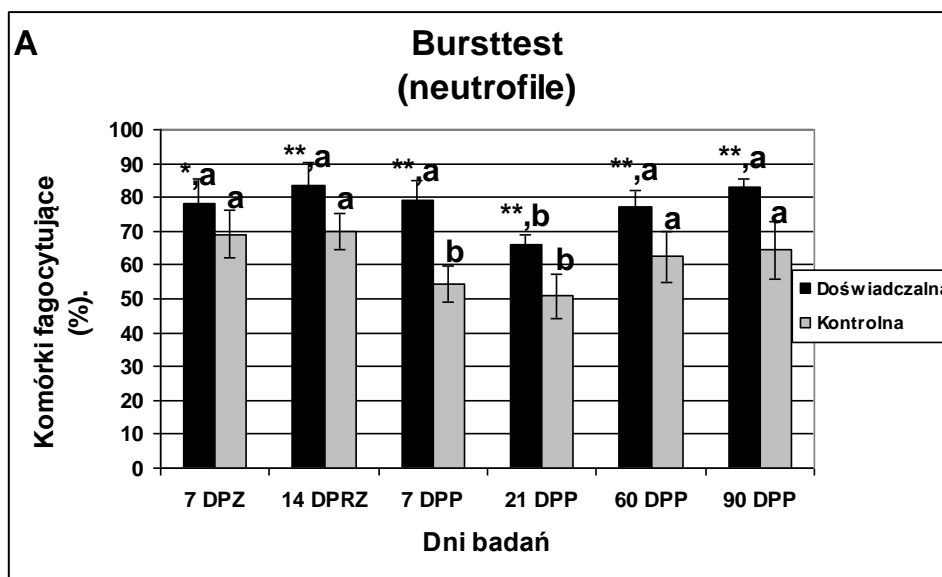


Fig. 2. Cytometryczna analiza wewnątrzkomórkowej bójczości neutrofilii (A, B), w krwi obwodowej krów, w różnych okresach laktacji, DPZ – dzień przed zasuszeniem; DPRZ – dzień przed porodem; DPP – dzień po porodzie. Doświadczalna – krowy z probiotykiem (n=10); Kontrolna – krowy bez probiotyku (n=10). Komórki fagocytujące (%) – jest to procent komórek fagocytujących produkujących reaktywne formy tlenu (mierzone przez konwersję DHR123 na R123). Średnia intensywność fluorescencji (SIF) - aktywność enzymatyczna komórek fagocytarnych (mierzona ilością R123 na jedną komórkę). Istotność statystyczna na poziomie * – $p < 0.05$ oraz ** – $p < 0.01$ w porównaniu do grupy kontrolnej. a-c różnice istotne statystycznie, pomiędzy wynikami uzyskanymi w różnym czasie w danej grupie, na poziomie $p < 0.01$.

4.2. Zachowanie się poszczególnych subpopulacji leukocytów u krów podczas trwania doświadczenia.

Procentowy udział poszczególnych subpopulacji leukocytów w obu badanych grupach krów w przebiegu doświadczenia przedstawiony został w tabeli 5. Przedstawione tam dane wykazały, że procentowy udział integrzyn $\beta 2$ (CD18+) na wszystkich leukocytach (limfocyty, granulocyty, monocyty), był istotnie wyższy u krów grupy doświadczalnej, przez cały okres doświadczenia z wyjątkiem pierwszego terminu badań 7dni przed zasuszeniem, w którym uzyskane wartości były zbliżone w obu grupach krów. W grupie doświadczalnej w przebiegu doświadczenia obserwowano wzrost ilości receptorów CD18 na limfocytach w 7 DPP ($7,22 \pm 2,9$), na granulocytach i monocytach w 60 i 90DPP w porównaniu do pozostałych terminów badań ($p < 0,01$). W grupie kontrolnej wartości CD18 na limfocytach w następujących po sobie terminach badań obniżały się i na niskim poziomie pozostały do końca doświadczenia. Wartości CD18 na granulocytach i monocytach po obniżeniu się, wzrosły w 60 i 90DPP do wartości wyższych niż wyjściowe.

Procentowy udział integrzyn αM (CD11b+) na limfocytach był istotnie wyższy w 7 DPZ, 14DPRP oraz 60 i 90 DPP w porównaniu do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej ($p < 0,01$). Ilość receptorów CD11b na monocytach była istotnie wyższa w 14 DPRP oraz 60 DPP w grupie doświadczalnej w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,01$).

Liczba limfocytów B CD21+ była istotnie wyższa w 14 DPRP ($p < 0,05$) i 60 DPP ($p < 0,01$) u krów grupy kontrolnej w porównaniu do grupy doświadczalnej. Natomiast w 90 DPP uzyskano wartości wyższe w grupie doświadczalnej niż kontrolnej ($p < 0,01$). Wartości te w obu grupach krów utrzymywały się na stałym podobnym poziomie przez cały okres trwania doświadczenia, jedynie w grupie doświadczalnej obserwowano opisany wzrost w 90 DPP.

Liczba limfocytów B CD25+ u krów grupy doświadczalnej, była istotnie wyższa we wszystkich terminach badań w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,01$) jedynie w 7DPZ wartości w obu grupach były zbliżone. W grupie doświadczalnej ilość limfocytów CD25+ obniżyła się jedynie w 14 DPRP ($8,13 \pm 0,6$), a w następnych terminach badań podwyższała się istotnie powyżej wartości wyjściowych ($23,22 \pm 2,94$). W grupie kontrolnej wartości limfocytów B CD25+ obniżyły się istotnie w 14 DPRP i 7 DPP, a następnie podwyższały się stopniowo w kolejnych terminach badań, do wartości ($15,8 \pm 2,77$).

Procent limfocytów T CD4+ w 21 DPP ($p < 0,05$), 60 i 90 DPP ($p < 0,01$), był wyższy u krów grupy doświadczalnej niż kontrolnej, u krów doświadczalnych były to też wartości wyższe w porównaniu do wcześniejszych terminów badań. W grupie kontrolnej wartości limfocytów

CD4+ utrzymywały się na podobnym poziomie przez cały czas trwania doświadczenia, z obniżeniem wartości w 7 DPZ i 90 DPP ($p<0,01$).

Odsetek limfocytów CD8+ w grupie doświadczalnej był niższy w porównaniu do grupy kontrolnej w 14 DPRP, 21 DPP ($p<0,05$) oraz w 90 DPP ($p<0,01$). Uzyskane wartości u krów doświadczalnych utrzymywały się na podobnym poziomie we wszystkich terminach badań. W grupie kontrolnej wartości te wahały się od $9,69\pm 1,11$ w 7 DPZ do $16,56\pm 0,46$ w 90 DPP i była to wartość najwyższa, w pozostałych terminach badań uzyskano wartości pośrednie.

Wartości limfocytów Foxp3+ były wyższe u krów grupy doświadczalnej w porównaniu do krów grupy kontrolnej, we wszystkich terminach badań z wyjątkiem 7 DPZ (gdzie były niższe niż w grupie kontrolnej). Istotnie statystycznie różnice pomiędzy tymi grupami wykazano w 7, 60 i 90 DPP ($p<0,01$).

Tabela 5. Fenotypowanie leukocytów (procentowy udział, poszczególnych subpopulacji leukocytów), w krwi obwodowej krów doświadczalnych i kontrolnych w przebiegu doświadczenia.

Rodzaj badania	Grupa	7 dni przed zasuszeniem	14 dni przed porodem	7 dni po porodzie	21 dni po porodzie	60 dni po porodzie	90 dni po porodzie
CD 18+ Limfocyty	D	6,0 $\pm 0,6$ a	5,1** $\pm 0,6$ b	7,22** $\pm 2,9$ a	4,6** $\pm 1,5$ b	4,7** $\pm 1,2$ b	4,2* $\pm 0,9$ b
	K	6,6 $\pm 0,9$ a	3,2 $\pm 0,6$ b	2,8 $\pm 0,5$ b	2,6 $\pm 0,8$ b	2,8 $\pm 0,6$ b	3,3 $\pm 0,3$ b
CD 18+ Granulocyty	D	12,5 $\pm 3,9$ a	11,7** $\pm 3,2$ a	6,8* $\pm 1,6$ b	11,0** $\pm 2,3$ a	23,0** $\pm 1,6$ c	24,7** $\pm 2,5$ c
	K	14,8 $\pm 3,0$ a	6,2 $\pm 1,7$ b	4,9 $\pm 1,7$ b	4,4 $\pm 1,5$ b	11,6 $\pm 2,6$ c	18,3 $\pm 4,6$ a
CD 18+ Monocyty	D	11,7** $\pm 1,4$ a	4,5 $\pm 1,5$ b	8,6* $\pm 2,9$ c	9,5** $\pm 1,8$ c	18,0** $\pm 1,4$ d	16,1* $\pm 1,8$ d
	K	5,8 $\pm 1,4$ a	5,2 $\pm 0,9$ a	6,3 $\pm 0,6$ a	4,6 $\pm 0,8$ a	10,9 $\pm 1,4$ b	13,4 $\pm 1,4$ c
CD 11b+ limfocyty	D	23,1* $\pm 4,4$ a	23,7** $\pm 4,0$ a	14,2 $\pm 1,2$ b	15,5 $\pm 2,2$ b	21,8** $\pm 2,1$ a	30,4** $\pm 3,3$ c
	K	19,5 $\pm 2,6$ a	16,0 $\pm 2,1$ b	13,2 $\pm 2,8$ b	14,1 $\pm 2,0$ b	17,0 $\pm 3,0$ ab	25,2 $\pm 3,1$ c
CD 11b+ granulocyty	D	98,5* $\pm 0,9$	98,9 $\pm 0,9$	99,7 $\pm 0,1$	99,7 $\pm 0,2$	99,9 $\pm 0,0$	99,6 $\pm 0,1$
	K	99,5 $\pm 0,3$ a	98,1 $\pm 0,9$ b	99,8 $\pm 0,1$ a	99,7 $\pm 0,1$ a	99,8 $\pm 0,1$ a	99,9 $\pm 0,1$ a
CD 11b+ monocyty	D	76,1 $\pm 4,2$ a	78,1** $\pm 4,1$ a	74,4 $\pm 5,8$ a	61,8 $\pm 5,0$ b	70,3** $\pm 4,2$ ab	69,3 $\pm 4,1$ ab
	K	73,3 $\pm 4,9$ a	69,8 $\pm 7,1$ a	71,2 $\pm 6,6$ a	61,0 $\pm 8,9$ b	56,0 $\pm 8,7$ b	65,9 $\pm 4,1$ b
Limfocyty CD21+	D	23,4 $\pm 3,78$ a	21,14* $\pm 4,56$ a	24,72 $\pm 3,86$ a	24,74 $\pm 4,62$ a	22,28** $\pm 4,38$ a	33,32** $\pm 2,76$ b
	K	24,88 $\pm 1,68$	25,4 $\pm 3,02$	25,62 $\pm 1,32$	25,56 $\pm 3,32$	25,5 $\pm 1,38$	25,5 $\pm 1,64$

Limfocyty CD25+	D	10,76 ±2,28 a	8,13** ±0,6 a	14,9** ±2,19 b	20,4** ±2,62 c	17,86** ±3,0 bc	23,22** ±2,94 c
	K	9,26 ±1,28 a	6,51 ±1,45 b	6,63 ±1,66 b	10,75 ±2,28 a	11,78 ±1,18 a	15,8 ±2,77 c
Limfocyty CD4+	D	28,96 ±2,12 a	32,8 ±2,66 b	34,04 ±2,92 bc	35,72* ±2,32 bc	36,62** ±1,32 c	34,94** ±1,66 bc
	K	26,64 ±2,52 a	33,4 ±1,72 b	33,72 ±0,32 b	33,9 ±0,52 b	32,62 ±2,32 bc	30,72 ±0,96 c
Limfocyty CD8+	D	10,56 ±1,6	11,55* ±1,12	11,96 ±0,97	10,47* ±1,69	10,15 ±1,84	11,47** ±1,48
	K	9,69 ±1,11 a	13,18 ±1,56 b	10,87 ±0,78 a	13,04 ±2,27 b	10,94 ±2,12 a	16,56 ±0,46 c
Limfocyty Foxp3+	D	42,54 ±4,44 a	44,34 ±3,06 a	49,44** ±4,18 b	42,56 ±4,88 a	47,68** ±3,84 ab	46,22** ±4,42 ab
	K	44,08 ±3,52 ab	43,98 ±1,44 ab	40,44 ±4,18 a	41,1 ±2,64 a	45,78 ±3,26 b	33,92 ±2,12 c

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej
a – d – różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi terminami badań w danej grupie.

4.3. Stężenie surowiczego amyloidu A u krów doświadczalnych w przebiegu doświadczenia.

Stężenie surowiczego amyloidu A (SAA), u krów doświadczalnych było istotnie niższe niż u krów grupy kontrolnej, przez cały czas trwania doświadczenia za wyjątkiem pierwszego terminu badań – 7 dni przed zasuszeniem (DPZ), w którym odnotowano podobne wartości. U krów grupy doświadczalnej najwyższą wartość SAA uzyskano właśnie w pierwszym terminie badań, następnie wartości te obniżyły się i na tym poziomie pozostawały do końca trwania doświadczenia. W grupie kontrolnej wartości SAA w 7 DPZ, były najniższe ($27,09 \pm 5,3$), następnie odnotowano ich wzrost ($44,19 \pm 2,74$) w 14 dniu przed porodem, kolejny spadek ($34,13 \pm 3,63$) w 21 dniu po porodzie (DPP), i znowu wzrost ($39,15 \pm 4,44$) w 60 DPP i na tym poziomie pozostawały do końca trwania doświadczenia (Tabela 6; Figura 3.).

Tabela 6. Poziom surowiczego amyloidu A (SAA) (ng/mL), u krów doświadczalnych w przebiegu doświadczenia.

Rodzaj badania	Grupa	7 dni przed zasuszeniem	14 dni przed porodem	7 dni po porodzie	21 dni po porodzie	60 dni po porodzie	90 dni po porodzie
Stężenie SAA (ng/mL)	D	25,1 ±4,82 a	17,76** ±2,08 b	18,59** ±2,58 b	17,04** ±1,85 b	18,39** ±2,2 b	17,13** ±1,61 b
	K	27,09 ±5,3 a	44,19 ±2,74 b	42,27 ±5,78 b	34,13 ±3,63 c	39,15 ±4,44 bc	39,35 ±4,36 bc

** - różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej $p < 0.01$

a – c – różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi terminami badań w danej grupie.

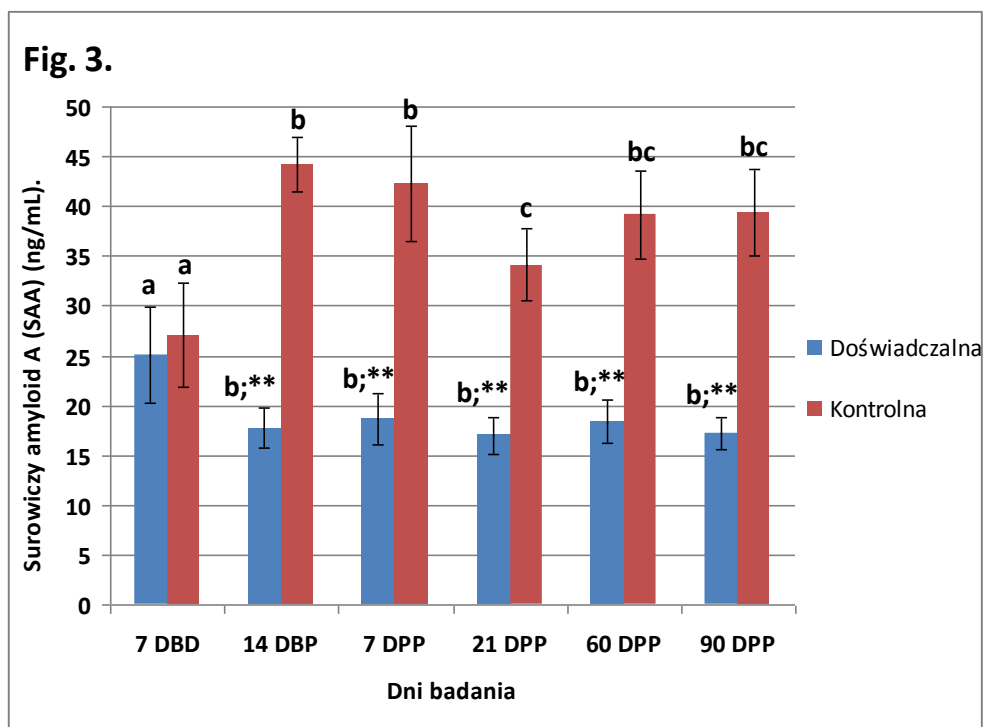


Fig. 3. Poziom surowiczego amyloidu A (SAA) (ng/mL), u krów doświadczalnych w przebiegu doświadczenia. DPZ – dzień przed zasuszeniem; DPRZ – dzień przed porodem; DPP – dzień po porodzie. Doświadczalna – krowy z probiotykiem (n=10); Kontrolna – krowy bez probiotyku (n=10). * – istotność statystyczna na poziomie $p < 0.01$ w porównaniu do grupy kontrolnej. a-c różnice istotne statystycznie, pomiędzy wynikami uzyskanymi w różnym czasie w danej grupie, na poziomie - $p < 0.01$.

4.4. Aktywność fagocytarna i wewnątrzkomórkowa bójczość komórek fagocytujących u cieląt doświadczalnych w przebiegu doświadczenia.

Odsetek fagocytujących neutrofilów oraz monocytów a także średnia intensywność fluorescencji (SIF) obu wymienionych rodzajów komórek fagocytujących u cieląt w grupie doświadczalnej były istotnie wyższe, w porównaniu do grupy kontrolnej, przez cały okres trwania doświadczenia ($p < 0.001$) (Tabela 7). Porównując wartości uzyskane w danej grupie w różnych terminach badań wykazano, że procent oraz SIF fagocytujących neutrofilów u cieląt grupy doświadczalnej były najniższe w 21 dniu po porodzie (odsetek kom. fag. - $91,63 \pm 1,28$; SIF - $584,64 \pm 28,74$). Wartości te następnie wzrastały do wartości wyjściowych (% kom. fagocytujących) lub powyżej w przypadku SIF. W grupie kontrolnej odsetek fagocytujących neutrofilów był najniższy w 21 dniu a SIF w 60 dniu po urodzeniu, wartości te do zakończenia doświadczenia nie powróciły do wartości wyjściowych (Tabela 7). Odsetek fagocytujących monocytów i SIF monocytów w obu badanych grupach cieląt miały najniższe wartości w 60 dniu po urodzeniu. U cieląt w grupie doświadczalnej w ostatnim terminie badań (120 dzień),

obserwowano wzrost wartości SIF monocytów ($348,78 \pm 18,96$), zbliżony do wartości wyjściowych ($358,98 \pm 26,64$). A odsetek monocytów fagocytujących ($81,98 \pm 3,76$) w tym okresie, wzrósł powyżej wartości wyjściowych ($78,98 \pm 1,86$). U cieląt w grupie kontrolnej wartości te nie powróciły do wyjściowych. W wewnątrzkomórkowej bójczości (Bursttest), zarówno % komórek fagocytujących, jak i SIF neutrofilii uzyskane w obu badanych grupach cieląt najniższe wartości uzyskano w 60 dniu po urodzeniu i wartości te nie powróciły do wartości uzyskanych w pierwszym terminie badań. Jednak w grupie cieląt doświadczalnych obserwowano istotny wzrost wartości w 21 dniu po urodzeniu w porównaniu do pozostałych terminów badań (Tabela 7).

Tabela 7. Aktywność fagocytarna i wewnątrzkomórkowa bójczość granulocytów i monocytów w krwi cieląt w grupie doświadczalnej i kontrolnej w przebiegu doświadczenia.

Rodzaj badania	Grupa	48 godzin po urodzeniu.	21 dni po urodzeniu.	60 dni po urodzeniu.	120 dni po urodzeniu.
% komórek fagocytujących (granulocyty)	D	95,82** ±0,98 a	91,63** ±1,28 b	93,62** ±1,78 ab	96,44** ±2,32 a
	K	90,82 ±3,98 a	83,62 ±1,27 b	86,38 ±3,0 ab	89,44 ±3,58 b
Intensywność fluorescencji (granulocyty)	D	595,28** ±17,46 a	584,64** ±28,74 a	600,16** ±78,38 ab	645,18** ±24,32 b
	K	431,64 ±18,46 a	485,34 ±38,74 b	363,96 ±57,8 c	425,14 ±25,96 a
% komórek fagocytujących (monocyty)	D	78,98** ±1,86 a	76,26** ±3,28 ab	74,98** ±1,26 b	81,98** ±3,76 ac
	K	69,52 ±4,6	66,46 ±5,28	65,32 ±3,1	63,44 ±5,24
Intensywność fluorescencji (monocyty)	D	358,98** ±26,64 ab	365,8** ±22,96 a	327,8** ±22 b	348,78** ±18,96 ab
	K	276,82 ±20,2 a	265,4 ±26,94 ab	239,32 ±27,7 b	259,2 ±30,6 ab
Bójczość granulocytów po aktywacji PMA (% kom.pobudzonych)	D	83,62** ±1,56 a	86,84** ±2,58 b	76,14** ±1,94 c	80,54** ±2,88 a
	K	76,82 ±3,56 a	73,26 ±5,58 ac	59,98 ±3,0 b	70,4 ±4,58 c
Intensywność fluorescencji granulocytów po aktywacji PMA	D	860,62** ±30,66 ab	888,72** ±22,0 b	792,08** ±31,88 c	850,52** ±27,52 a
	K	535,12 ±39,76 a	588,72 ±22,1 b	426,24 ±23,82 c	486,16 ±27,43 d

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej
a – d – różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi terminami badań w danej

4.5. Zachowanie się poszczególnych subpopulacji leukocytów u cieląt podczas trwania doświadczenia.

Przedstawione dane wykazały, że procentowy udział integryn $\beta 2$ (CD18+) na limfocytach i monocytach, był istotnie wyższy u cieląt grupy doświadczalnej, przez cały okres doświadczenia począwszy od 48 godziny do 120 dnia po ich urodzeniu ($p < 0,01$). Wartości CD18+ na granulocytach były istotnie wyższe w grupie doświadczalnej w 60 i 90 dniu po urodzeniu cieląt. W przebiegu doświadczenia w obu badanych grupach cieląt obserwowano wzrost wartości CD18+ na limfocytach i monocytach w pierwszych trzech okresach badań a następnie ich spadek w 120 dniu po urodzeniu. Natomiast wartości CD18+ na granulocytach w obu grupach cieląt wzrastały stopniowo do końca trwania badań (Tab. 8). Procentowy udział integryn αM (CD11b+) na limfocytach i monocytach u cieląt doświadczalnych, był istotnie wyższy we wszystkich terminach badań w porównaniu do wartości uzyskanych u cieląt kontrolnych. Procentowy udział limfocytów CD11b+ w obu grupach stopniowo wzrastał w poszczególnych okresach badań osiągając najwyższe wartości w 120 dniu po urodzeniu. Natomiast CD11b+ na monocytach w obu grupach cieląt, były najwyższe w 48 godzinie po urodzeniu a następnie stopniowo obniżały się do końca trwania doświadczenia (Tabela 8).

Procentowy udział limfocytów CD21+ był istotnie wyższy w grupie cieląt doświadczalnych, we wszystkich terminach badań w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,01$). W obu grupach wartości tych limfocytów wzrastały stopniowo do najwyższych w 120 dniu po urodzeniu.

Procentowy udział limfocytów CD25+ był istotnie wyższy u cieląt doświadczalnych, we wszystkich terminach badań w porównaniu do cieląt kontrolnych ($p < 0,01$). Najniższe wartości tych limfocytów uzyskano w 48 godzinie po porodzie a następnie odnotowano ich wzrost i utrzymywanie się na podobnym poziomie do końca badań (Tabela 8).

Odsetek limfocytów CD4+, był wyższy u cieląt doświadczalnych niż kontrolnych, przez cały czas trwania doświadczenia ($p < 0,01$). W obu grupach cieląt uzyskano wzrost wartości w 21 dniu po urodzeniu a następnie ich stopniowy spadek do końca trwania doświadczenia.

Odsetek limfocytów CD8+ w grupie doświadczalnej był wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak istotność statystyczną wykazano jedynie w 60 dniu po urodzeniu ($p < 0,01$).

Wartości limfocytów Foxp3+ były wyższe w grupie kontrolnej w porównaniu do krów grupy doświadczalnej, jednak istotnie statystycznie różnice pomiędzy tymi grupami wykazano w 48 godzinie i 120 dniu, po urodzeniu cieląt ($p < 0,01$) (Tabela 8).

Tabela 8. Fenotypowanie leukocytów (procentowy udział, poszczególnych subpopulacji leukocytów), w krwi obwodowej cieląt grupy doświadczalnej i kontrolnej w przebiegu doświadczenia.

Rodzaj badania	Grupa	48 godz. po urodzeniu.	21 dni po urodzeniu.	60 dni po urodzeniu.	120 dni po urodzeniu.
CD 18+ Limfocyty	D	5,37** ±0,28 a	5,91** ±0,68 a	9,13** ±1,59 b	6,03** ±0,32 c
	K	3,61 ±0,53 a	3,53 ±1,65 a	5,91 ±1,85 b	3,41 ±0,82 a
CD 18+ Granulocyty	D	4,61 ±0,62 a	5,17 ±0,68 a	9,99** ±1,68 b	25,86** ±2,44 c
	K	3,41 ±0,42 a	4,17 ±1,34 ab	5,91 ±1,85 b	17,43 ±3,01 c
CD 18+ Monocyty	D	11,95** ±1,38 a	13,55** ±2,36 ab	16,7** ±2,36 b	14,84** ±1,34 b
	K	7,95 ±1,23 a	9,15 ±3,24 ab	12,55 ±3,24 b	10,76 ±2,34 b
CD 11b+ limfocyty	D	4,9* ±2,06 a	13,81* ±2,41 b	23,62** ±3,28 c	34,52** ±1,3 d
	K	3,27 ±0,5 a	10,13 ±3,87 b	16,19 ±6,12 c	29,71 ±2,14 d
CD 11b+ granulocyty	D	99,76** ±0,1	98,92 ±1,04	99,84 ±0,6	99,48 ±0,8
	K	98,16 ±0,3	98,12 ±1,24	99,62 ±0,16	99,86 ±0,21
CD 11b+ monocyty	D	88,22** ±1,64 a	62,12** ±5,6 b	53,94** ±6,74 c	57,62** ±3,0 c
	K	84,16 ±1,24 a	51,13 ±7,6 b	45,02 ±4,08 b	47,74 ±6,82 b
Limfocyty CD21+	D	10,49 ±1,38 a	19,94** ±1,12 b	33,64* ±3,74 c	35,84** ±1,14 c
	K	10,39 ±2,61 a	13,24 ±1,12 b	28,26 ±5,78 c	30,52 ±3,04 c
Limfocyty CD25+	D	3,93** ±1,0 a	18,94** ±2,74 b	16,78** ±1,6 b	15,93* ±3,24 b
	K	2,34 ±0,37 a	10,76 ±3,46 b	11,69 ±2,14 b	11,72 ±3,24 b
Limfocyty CD4+	D	25,92** ±1,58 ab	27,12** ±0,78 a	23,02** ±3,44 b	17,93** ±1,24 c
	K	21,65 ±2,54 a	22,35 ±1,87 a	16,84 ±3,04 b	13,72 ±3,24 b
Limfocyty CD8+	D	15,64 ±2,48 a	12,97 ±2,0 b	13,0** ±1,04 b	12,39 ±2,14 b
	K	14,56 ±3,98 a	10,87 ±2,67 ab	9,52 ±0,74 b	11,71 ±1,1 ab
Limfocyty Foxp3+	D	1,53** ±0,18 a	1,50 ±0,20 a	1,49 ±0,2 a	1,04** ±0,25 b
	K	1,89 ±0,24 a	1,55 ±0,25 b	1,7 ±0,29 ab	1,65 ±0,3 ab

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej
a – d – różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi terminami badań w danej grupie

5. Dyskusja

W badaniach własnych oceniono wybrane wskaźniki ogólnoustrojowej, odpowiedzi immunologicznej u krów w okresie od ostatniego tygodnia poprzedniej laktacji, poprzez okres zasuszenia, okołoporodowy aż do szczytu kolejnej laktacji tj. do 90 dnia po porodzie (DPP). Badania przeprowadzono w celu sprawdzenia czy zastosowany probiotyk miał wpływ na funkcję układu immunologicznego u krów mlecznych w różnych okresach laktacji. Mało jest prac badawczych opisujących konkretny wpływ probiotyków na określone parametry układu immunologicznego u krów mlecznych. Większość prac dotyczących bydła zawiera jedynie ogólne stwierdzenia, że probiotyki mają działanie immunomodulujące u tego gatunku zwierząt. Ponadto większość publikacji odnoszących się do układu odpornościowego dotyczy ograniczonego czasu stosowania probiotyków i krótkiego okresu obserwacji, często badania zawęża się do okresu przejściowego (Deng i in., 2015; Punetha i in., 2018). Co prawda ze względu na konieczność dostosowania się krów mlecznych do zaawansowanych zmian metabolicznych zachodzących w ich organizmie spowodowanych porodem i rozpoczynającą się produkcją mleka okres ten jest najważniejszy podczas trwania laktacji (Sordillo i Mavangira, 2014, Goff, 2006). Jednak do zmiany warunków żywienia u krów mlecznych w całym okresie produkcyjnym dochodzi kilka razy. Pierwszy raz przed zasuszeniem, następnie w okresie przejściowym a także podczas dostosowywania dawki pokarmowej po porodzie do aktualnej wydajności mlecznej krów. W związku z tym według autora istotna jest wiedza dotycząca zastosowania probiotyków w różnych okresach laktacji, czy ich podawanie ma uzasadnienie pod względem wspomagania aktywności układu odpornościowego, czy ewentualnie wystarczy ograniczyć ich zastosowanie do okresu przejściowego jak zostało to już opisane przez innych autorów (Deng i in., 2015; Punetha i in., 2018). Zgodnie z wynikami własnych badań zarówno aktywność fagocytarna jak i bójcza komórek fagocytujących przed zastosowaniem probiotyków (przed zasuszeniem) była zbliżona w obu badanych grupach krów, a wartości SIF (średnia intensywność fluorescencji) granulocytów i monocytów (Fagotest) były nawet niższe w grupie doświadczalnej niż kontrolnej. Po 4 tygodniach podawania preparatu probiotycznego (14 dni przed porodem - DPRP) wymienione parametry immunologiczne w grupie doświadczalnej uległy podwyższeniu i były wyższe w porównaniu do wskaźników grupy kontrolnej do końca trwania badań. Ponadto w ocenianych subpopulacjach leukocytów u krów grupy doświadczalnej podczas trwania doświadczenia obserwowano wzrost odsetka limfocytów regulatorowych Foxp3+ oraz aktywowanych limfocytów B (CD25+) z jednoczesnym obniżeniem się procentowej ilości nieaktywowanych

limfocytów B (CD21+). Oznaczać to może, że następstwem wzrostu procentowej zawartości limfocytów regulatorowych jest aktywacja limfocytów B, przejawiająca się zwiększoną obecnością na limfocytach receptora aktywacyjnego CD25+. Świadczyć to może nie tylko o opisaney wcześniej, wzmożonej aktywności mechanizmów komórkowych (fagocytoza i bójczość fagocytów) ale również o uruchomieniu humoralnych mechanizmów odporności immunologicznej w omawianej grupie krów. Zmiany te mogą być efektem uruchomienia procesów regulatorowych w układzie immunologicznym krów otrzymujących probiotyk. Limfocyty regulatorowe, poprzez wydzielane przez nie cytokiny przeciwzapalne jak np. interleukina 10 (IL10), przyczyniają się do utrzymania stabilizacji układu immunologicznego krów. Aktywowane są odpowiednie mechanizmy niezbędne do likwidacji ewentualnego zagrożenia i jednoczesnego utrzymania homeostazy organizmu. Przyczyniają się do tego również limfocyty T wspomagające CD4+, których zadaniem jest wspieranie aktywności komórkowych jak i humoralnych mechanizmów odporności. Aktywowane określone subpopulacje wspomagających limfocytów T (Th) poprzez wydzielanie odpowiednich cytokin, nadają kierunek odpowiedzi immunologicznej - Th1, Th2 lub Th17 (Gourbeyre i in., 2011). W badaniach własnych nie zastosowano dokładniejszego różnicowania kierunku odpowiedzi immunologicznej ponieważ nie oceniano stężenia cytokin jednak, w trakcie badań obserwowano wyższy odsetek limfocytów TCD4+ u krów otrzymujących probiotyk w porównaniu do krów grupy kontrolnej, przez cały okres poporodowy. Ponadto w grupie doświadczalnej obserwowany był również wzrost i utrzymywanie się na wysokim poziomie odsetka leukocytów (limfocyty, granulocyty, monocyty) posiadających receptory integryn $\beta 2$ (CD18+) oraz integryn αM (CD11b+), co wiązać należy z gotowością i możliwością, przylegania leukocytów do śródbłonna naczyń krwionośnych oraz ich wyhamowywanie w miejscu docelowym. Następnym etapem rozpoczętego procesu diapedezy (w którym aktywny udział biorą integryny), jest przenikanie przez ścianę naczyń krwionośnych do tkanek i zwalczanie lub usuwanie, ewentualnego zagrożenia w miejscu narażenia w tkankach obwodowych. Należy zwrócić szczególną uwagę na mechanizmy immunologiczne zachodzące u krów w grupie kontrolnej, których przebieg oraz kierunek, można ocenić podobnie jak w grupie doświadczalnej biorąc pod uwagę proporcje pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami leukocytów, jednak poziom aktywności układu odpornościowego w tej grupie krów był znacząco niższy. Ponadto podwyższający się odsetek limfocytów cytotoksycznych/supresorowych (CD8+) w tej grupie krów w trzech terminach badań, przed porodem i po porodzie (patrz tabela 5), świadczyć może o okresowych zmianach kierunku

zachodzących mechanizmów immunologicznych z humoralnych na komórkowe a z pewnością świadczy o wahaniach w aktywności tych mechanizmów. Na dokładniejszą ocenę jest zbyt mało danych, jednak wyraźnie obserwujemy mniejszą stabilność w aktywności układu immunologicznego krów grupy kontrolnej porównując z grupą doświadczalną. Powyższe obserwacje są bardzo ważne, ponieważ pozwalają przypuszczać, że krowy, które otrzymywały probiotyk, miały wyższy status immunologiczny już przed porodem i mogły łatwiej adaptować się do trudnych warunków występujących w okresie poporodowym, kiedy jak wynika z dostępnych publikacji, występuje osłabienie odporności u krów a przez to, narażenie na choroby infekcyjne głównie macicy i wymienia (McArt i in., 2012; Mulligan i Doherty, 2008; Ribeiro i in., 2013). Przyczyny obniżonej odporności w tym okresie nie do końca są poznane, jednak badania przeprowadzone przez niektórych autorów wykazały, że podwyższony poziom niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (non esterificate faty acid - NEFA) w krwi krów, podczas okołoporodowego ujemnego bilansu energetycznego (negative energy balans - NEB), mogą przyczynić się do immunosupresji (van Kneysel i in., 2007; Goff, 2006; Graugnard i in., 2012). Wykazano również, że stężenie ciał ketonowych podobne do tego obserwowanego w okresie okołoporodowym, pogarszają zdolność fagocytarną i bójczą neutrofilii (PMN) *in vitro* (Suriyasathaporn i in., 1999; Graugnard i in., 2012). Podobnie wysokie stężenia NEFA negatywnie wpływa na aktywność PMN krów *in vitro* (Scalia i in., 2006; Graugnard i wsp., 2012). Nie wiadomo, w jaki sposób NEFA negatywnie wpływa na funkcję komórek fagocytujących, według badań przedstawionych przez Ingvarlsen i Moyes (2015) kwasy tłuszczowe mogą mieć również działanie wspomagające aktywność komórek fagocytujących, zależy to od rodzaju kwasów tłuszczowych powstających w organizmie krów. Badania własne nie obejmowały wprawdzie oceny poziomu NEFA i β -hydroksymaślanu (β -hydroksybutyric acid – BHBA), jednak nie można wykluczać, że stężenie tych metabolitów było podwyższone u badanych krów. Wydaje się to prawdopodobne, ponieważ, w 21 DPP nie udało się uniknąć spadku ocenianych parametrów immunologicznych, w obu badanych grupach krów, jednak u krów doświadczalnych były one ok. 2x wyższe niż u krów kontrolnych, u których nie stosowano probiotyku. Ponadto, w ostatnim terminie badań, wszystkie oceniane parametry u krów doświadczalnych były wyższe od wartości wyjściowych, natomiast w grupie kontrolnej większość z nich była niższa. Może to świadczyć o utrzymywaniu się wyższego statusu immunologicznego u krów otrzymujących probiotyk w całym okresie laktacji i ich mniejszej podatności na choroby infekcyjne. Jednak nie wiadomo, czy może to być związane z niższą zawartością wymienionych wcześniej

markerów NEB. Badania przedstawione przez Nocek i in. (2003) wydają się potwierdzać te przypuszczenia, ponieważ wykazały niższe stężenie NEFA u krów, które otrzymywały karmę z dodatkiem *Enterococcus faecium*. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy po zastosowaniu *Bacillus subtilis natto*, jako dodatku żywieniowego (Peng i in., 2012). Badania Nocek i Kautz (2006) wykazały, że krowy otrzymujące *Enterococcus faecium* miały niższe stężenie β -hydroksymaślanu w okresie poporodowym. Luan i in. (2015) również zaobserwowali mniej związków ketonowych po wycieleniu u krów otrzymujących *Bacillus pumilus* jako dodatek żywieniowy. Niższe stężenie NEFA oraz ciał ketonowych wskazuje, że krowy mobilizują mniej energii z tkanki tłuszczowej, podczas wysokiego na nią zapotrzebowania przy rozpoczynającej się laktacji. Ponadto w surowicy krwi krów po zastosowaniu *Enterococcus faecium* w okresie poporodowym, wykazano wyższe stężenie glukozy oraz insuliny w porównaniu do zwierząt nie otrzymujących probiotyków (Nocek i in., 2003). Wyższy poziom glukozy we krwi oraz niższa mobilizacja tkanki tłuszczowej (niższe NEFA i BHBA) w okresie poporodowym, jest bardzo korzystne dla krów, co najmniej z dwóch powodów. Po pierwsze więcej glukozy może zostać skierowane do wymienia, aby umożliwić wyprodukowanie większej ilości mleka, co jest ważne do utrzymania wysokiej wydajności mlecznej. Po drugie glukoza jest niezbędnym źródłem energii dla zachodzących procesów fizjologicznych w tym dla układu immunologicznego a zwłaszcza dla komórek fagocytujących, a NEB osłabia zarówno aktywność jak i wewnątrzkomórkową bójczość fagocytów (Hammona i in., 2006; Esposito i in., 2014; Ingvarlsen i Moyes, 2013).

W badaniach własnych nie można wykazać bezpośredniego wpływu probiotyków na status energetyczny krów, ponieważ nie oceniano powyżej omówionych wskaźników (NEFA, BHBA, glukoza) jednak pośrednio, poprzez wyraźny wzrost ocenianych parametrów immunologicznych, można przypuszczać, że to zastosowane w doświadczeniu probiotyki mogły poprawić bilans energetyczny krów a pośrednio również aktywność i zdolność do zabijania komórek fagocytujących. Potwierdzeniem tych przypuszczeń może być fakt, że probiotyki poprawiają znacznie strawność karmy spożywanej przez krowy i jednocześnie zwiększają stężenie w organizmie nie tylko substancji energetycznych, ale również białka, witamin i substancji mineralnych (Keller i in., 2010; Yoo i Kim, 2016). W badaniach własnych wykazano jedynie wyższe wartości parametrów białkowych (białko całkowite, albuminy i globuliny) w przebiegu całego doświadczenia (dane nie zamieszczone w pracy, dostępne u autora), u krów otrzymujących probiotyk w porównaniu do krów bez probiotyku. Pomimo, że wartości te nie różniły się istotnie statystycznie (jedynie w 21 DPP), to warto

odnotować te różnice pomiędzy ocenianymi grupami, ponieważ możliwe jest, że nawet nieznaczne różnice mogły mieć istotny wpływ dla aktywności układu immunologicznego. Probiotyki według Maldonado i in., (2019) mogą również w inny sposób oddziaływać stymulująco na układ immunologiczny zwierząt. Sama zmiana składu rodzaju flory bakteryjnej w przewodzie pokarmowym może według tych autorów zmienić kierunek stymulacji układu immunologicznego z Th2 (humoralnej) na Th1 (komórkową), utrzymując homeostazę immunologiczną w jelitach. Oznacza to, że probiotyki, mogą wpływać na komórki odpornościowe, głównie komórki dendrytyczne, limfocyty T, komórki plazmatyczne pobudzając odpowiednie ich subpopulacje do produkcji cytokin, dzięki czemu mogą one modulować odpowiedź immunologiczną (Dogi i in., 2008; Jiang i in., 2013; Petrof i in., 2004). Kierunek odpowiedzi zależy od rodzaju zastosowanego probiotyku, ponieważ różne szczepy probiotyczne, mogą stymulować wydzielanie innych cytokin (Foligné i in., 2016; Takeda i in., 2013; Sheikhi i in., 2017). Nie do końca poznany jest mechanizm utrzymywania homeostazy immunologicznej w jelitach. Jednak uważa się, że poprzez stymulację wydzielania cytokin, probiotyki pobudzają adaptacyjną odpowiedź immunologiczną, w której dominującą rolę odgrywają limfocyty T regulatorowe (CD4+CD25+, Foxp3), mające zdolność wytwarzania interleukiny 10 (IL-10 - antyinflamatory cytokine), dzięki której modulują odpowiedź immunologiczną (Lemme-Dumit i in., 2018; Sichetti i in., 2018). Ponadto probiotyki zwiększają wydzielanie immunoglobuliny A (IgA) w jelitach i okolicznych narządach limfatycznych, zwiększając pulę IgA w krwi obwodowej, chroniąc przez to, również inne błony śluzowe organizmu (Fernandez i in., 2003; De Moreno i in., 2005). Na podstawie badań własnych nie można jednoznacznie wykazać mechanizmu stymulującego aktywność fagocytarną i bójczą komórek immunokompetentnych oraz zmiany zachodzące w procentowym udziale poszczególnych subpopulacji leukocytów w organizmie krów doświadczalnych. Podobnie badania przeprowadzone przez Maldonado i in. (2011), wykazały wzrost aktywności fagocytarnej i bójczej makrofagów izolowanych z otrzewnej i śledziona oraz poprawę innych parametrów immunologicznych u myszy po zastosowaniu probiotyków, jako dodatku żywieniowego, w których autorzy również nie wskazują konkretnego mechanizmu immunomodulującego działania probiotyków. Nie można wykluczyć, że przedstawione powyżej sposoby immunomodulującego oddziaływania probiotyków, miały miejsce również w naszych badaniach. Szczególnie opisany już wcześniej wzrost liczby limfocytów regulatorowych Foxp3 u krów, u których stosowano probiotyk, wydaje się być wiodącym mechanizmem regulującym opisane powyżej zmiany. Mechanizm

ten w przeprowadzonych badaniach własnych pociągał za sobą wzrost limfocytów wspomagających TCD4+, aktywowanych limfocytów BCD25+ oraz integryn $\beta 2$ (CD18+) i integryn αM (CD11b+). Taki układ w subpopulacjach leukocytów przypuszczalnie umożliwiał jednoczesne wykorzystanie zarówno komórkowych (wrodzonych i nabytych) jak i humoralnych mechanizmów immunologicznych. Dlatego też można wnioskować, że układ immunologiczny krów, które otrzymywały probiotyk, był lepiej przygotowany do reakcji w przypadku zagrożenia w porównaniu do krów nieotrzymujących probiotyku. Jednocześnie pomimo gotowości układu immunologicznego, obserwowano również jego stabilizację a nawet uspokojenie. Należy przy tym, zwrócić szczególną uwagę na utrzymywanie się stałego, niskiego poziomu surowiczego amyloidu A (SAA) przez cały czas trwania doświadczenia, u krów w grupie otrzymującej probiotyk, w porównaniu do krów kontrolnych. Białka ostrej fazy (BOF) obecne w krwi, charakterystyczne dla bydła jak surowiczy amyloid A (SAA), są wytwarzane głównie przez hepatocyty w wątrobie w odpowiedzi na prozapalne cytokiny (np. IL-6 i TNF) oraz glikokortykoidy (Ametaj i in., 2011; Trevisi i in., 2012). SAA jest apolipoproteina pojawiająca się, do 24-48 godzin po zaistnieniu czynnika zapalnego np. po zakażeniu, jako białko stanowiące pierwszą linię reagowania, a jej wydzielanie uzależnione jest od IL-1 oraz/lub TNF- α (Petersen i in., 2004; Tothova i in., 2014). Zmiany w wydzielaniu SAA obserwowane są w wielu okolicznościach związanych zarówno z ogólnoustrojowymi jak i miejscowymi infekcjami organizmu, sytuacjami stresowymi, niedoborami a nawet podczas fizjologicznie przebiegających, zmianach zachodzących w różnych okresach laktacji (Brodzki i in., 2015a; 2015b; Tothova i in., 2014; Vargová i in., 2017). Obserwowane w badaniach własnych utrzymujące się wysokie stężenie SAA oraz jego istotne wahania w czasie trwania badań u krów, które nie otrzymywały probiotyku, mogą być przejawem ciągłej wzmożonej aktywności komórek odpornościowych należących do nieswoistych mechanizmów immunologicznych, której efektem jest właśnie produkcja BOF w komórkach wątrobowych. Może to oznaczać, że układ immunologiczny krów grupy doświadczalnej uruchamia odpowiednie procesy regulatorowe zapobiegające zbyt gwałtownej reakcji komórek odpornościowych na zaistniałe czynniki, pomimo ich gotowości. Inaczej mówiąc, tolerancja komórek efektorowych układu immunologicznego może być znacznie wyższa u krów, które otrzymywały probiotyk w porównaniu do krów żywionych bez jego dodatku. Ostatnie doniesienia wyraźnie wskazują, że zjawisko tolerancji układu immunologicznego ma bardzo istotne znaczenie w utrzymywaniu homeostazy organizmu krów (Sheldon i in., 2019).

Drugi etap przedstawianych badań przeprowadzono na cielętach pochodzących od krów z obu opisanych powyżej grup doświadczalnych. Badania przeprowadzono na dwóch grupach cieląt: grupa doświadczalna pochodząca od krów doświadczalnych - u których stosowano probiotyk, jako dodatek żywieniowy oraz grupa kontrolna, pochodząca od krów kontrolnych - u których probiotyków nie stosowano. Badania te obejmowały ocenę parametrów immunologicznych w krwi cieląt (tych samych, co u matek), w okresie od 48 godziny po urodzeniu do 120 dnia życia. Zgodnie z założeniami celu badań autor zwrócił szczególną uwagę na dwa elementy podczas doświadczenia: po pierwsze, czy podawanie probiotyków ciężarnym krowom miało wpływ na wybrane parametry odporności urodzonych przez nie cieląt; oraz po drugie, czy i w jaki sposób probiotyki podawane cielętom już po porodzie, jako dodatek do pokarmu, oddziaływały u nich na oceniane parametry układu immunologicznego. Dlatego też pierwsze pobranie materiału wykonano po upływie pierwszych 48 godzin od urodzenia się cieląt, czyli już w czasie uspokojenia po stresie po urodzeniowym, ale kiedy cielęta nie otrzymywały jeszcze, probiotyków (podawanie rozpoczęto w 3 dobie). Wyniki naszych badań jednoznacznie wykazały, że zarówno aktywność fagocytarna jak i wewnątrzkomórkowa zdolność zabijania komórek fagocytujących w 48 godzinie po urodzeniu, były znacząco wyższe u cieląt grupy doświadczalnej, pochodzących od krów, którym podawano probiotyk. Ponadto u cieląt tej grupy w pierwszym badaniu wykazano również, wyższy procentowy udziału wspomagających limfocytów TCD4+, aktywowanych limfocytów BCD25+, integryn β 2 (CD18+), integryn α M (CD11b+) oraz niższe wartości limfocytów regulatorowych Foxp3 w porównaniu do cieląt kontrolnych. Z danych tych wynikać może, że już w 2 dobie po porodzie, aktywacja układu immunologicznego u cieląt grupy doświadczalnej była rozpoczęta. Dotyczyła ona nie tylko mechanizmów wrodzonych (fagocytoza), ale również adaptacyjnych, opartych na czynnym udziale wspomagających limfocytów T CD4+, aktywowaniu limfocytów B oraz gotowości leukocytów do przechodzenia do tkanek obwodowych, czyli ewentualnych miejsc narażenia na zakażenie (np. układu oddechowego czy pokarmowego). Tak wczesna aktywacja układu immunologicznego u cieląt doświadczalnych może oznaczać, że podawanie probiotyków ciężarnym krowom miało istotny wpływ na wzrost aktywności komórek immunologicznych nie tylko u samych krów, ale również u cieląt urodzonych przez te krowy. Tak wyraźne różnice w wymienionych parametrach pomiędzy dwiema porównywanymi grupami cieląt doświadczalnych nie mogły być przypadkowe. Trudno jest wyjaśnić, w jaki sposób podawanie probiotyków krowom w

czasie ciąży, prowadzi do wzrostu aktywności komórek fagocytujących ich bójczości oraz aktywacji swoistych komórkowych mechanizmów immunologicznych u cieląt. Najbardziej prawdopodobne jest przyswojenie ciał odpornościowych nie tylko przeciwciał ale również leukocytów z siary od swoich matek (Chase i in., 2008). Siara zawiera od 1 10⁶ do 3 10⁶ komórek/ml i są to prawie wyłącznie leukocyty. Procentowa zawartość komórek odpornościowych w siarze jest podobna do krwi obwodowej krów, ale z większą frakcją makrofagów (40-50%) a mniejszą frakcją limfocytów (22%-25%) i neutrofilii (25%-37%) (Chase i in., 2008; Liebler-Tenorio i in., 2002; Reber i in., 2005). Większość limfocytów to limfocyty T, przy czym mniej niż 5% to limfocyty B. Jedynie część z tych matczyńskich komórek wchłania się z jelit do układu krążenia cieląt i osiągają szczytowy poziom 24 godziny po urodzeniu, ponieważ ich wchłanianie w późniejszym czasie spada (Reber i in., 2006). Badania własne wykonane w 48 godzinie po urodzeniu cieląt potwierdzają, że limfocyty T (CD4+ i CD8+), przeważały w oznaczonych subpopulacjach limfocytów, a limfocyty B (CD21+ i CD25+), stanowiły mniejszość w obu badanych grupach cieląt. Jednak u cieląt pochodzących od krów otrzymujących probiotyk istotnie wyższy był poziom zarówno limfocytów T jak i aktywowanych limfocytów BCD25+, co może wynikać zarówno z większej ilości limfocytów wchłoniętych z siary (ich matki miały istotnie wyższe wartości tych limfocytów), lub z aktywowania nabytej swoistej komórkowej odporności immunologicznej cieląt, proces ten musiałby rozpocząć się jeszcze podczas ciąży oraz wymagałby kontaktu płodu z antygenami drobnoustrojów. Co wydaje się mało prawdopodobne, przy założeniu, że środowisko ciężarnej macicy jest pozbawione drobnoustrojów a płód i jego układ odpornościowy nie ma kontaktu z bakteriami jelitowymi matki (Funkhouser i Brodenstein, 2013).

Jednak jak wykazały badania niektórych autorów u kobiet, łożysko oraz wody płodowe nie są sterylne, ale posiadają swoisty unikatowy mikrobiom, który może wpływać na kształtowanie się układu immunologicznego płodów (Aagaard i in., 2012; Stout i in., 2013; Leiby i in., 2018; Jimenez i in., 2008; Gomez i in., 2016). Ponadto badania przeprowadzone u kobiet i myszy wykazały, że bakterie jelitowe matki w czasie ciąży mogą przedostawać się do jelit płodów, czego dowodem jest potwierdzenie ich obecności w smółce noworodków (Ferretti i in., 2018; Hu i in., 2013; Madan i in., 2012; Ardissonne i in., 2014). Wykazano również, że mikrobiom jelitowy ciężarnych kobiet oraz myszy ma wpływ na programowanie układu immunologicznego płodów (Gomez i in., 2016). □ Badania przeprowadzone u myszy wykazały, że zmiana mikrobioty jelitowej matki podczas ciąży wpływa na wrodzoną

odporność urodzonych płodów w 14 dniu po porodzie (Nyangahu i in., 2018; Nyangahu i Jaspán, 2019). Mechanizmy, za pomocą, których mikrobiota matczyzna przed porodem, oddziałuje na płód nie zostały do chwili obecnej w pełni wyjaśnione. Jednak wydaje się oczywiste, że rozwój odporności u płodu rozpoczyna się przed porodem i jest prawdopodobnie spowodowany translokacją mikrobioty lub jej metabolitów z jelita matki do jednostki matczyno-płodowej, jaką jest łożysko (Nyangahu i Jaspán, 2019).

W przedstawionej przez Nyangahu i Jaspán (2019) pracy przeglądowej, autorzy wskazują na możliwe mechanizmy przemieszczania się mikrobioty jelitowej matki do płodu. Mechanizm ten może obejmować komórki dendrytyczne (DC) i fagocytykujące komórki CD18+, które pobierają nie patogenne bakterie ze światła jelita, a następnie transportują je do innych miejsc, w tym do gruczołów mlecznych i być może również do macicy i płodu (Rescigno i in., 2001; Vazquez-Terres i in., 1999). Możliwy jest również przez-łożyskowy transfer bakterii jelitowych lub ich części za pośrednictwem immunoglobulin (IgG) (Gomez i in., 2016). Sugeruje to, że programowanie odporności płodu w macicy jest częściowo zależne od przenoszenia składników bakteryjnych za pośrednictwem IgG. Oprócz immunomodulacji, w której pośredniczy IgG, w przezłożyskowej regulacji immunologicznej mogą również pośredniczyć cytokiny i hormony, a także składniki bakteryjne, takie jak lipopolisacharydy (PrabhuDas i in., 2016; Conrad i in., 2009). Powyższe mechanizmy zostały opisane głównie u myszy i kobiet u których jak powszechnie wiadomo występuje zupełnie inny typ łożyska (krwio - kosmówkowe) niż u krów (łącznotkankowo - kosmówkowe), co może znacząco utrudniać zachodzenie powyższych mechanizmów. Jednakże badania własne wykazały wyraźnie wyższe wartości ocenianych parametrów immunologicznych u cieląt pochodzących od krów żywionych z dodatkiem probiotyków. Ewidentnie wskazuje to na udział zastosowanych u krów drobnoustrojów probiotycznych w aktywacji układu immunologicznego cieląt, możliwe, że jeszcze podczas ciąży. Aby się o tym przekonać, potrzebne są dodatkowe, bardziej szczegółowe badania. Jednak już w chwili obecnej, istnieją prace badawcze potwierdzające wykrycie bakterii w smółce u nowonarodzonych cieląt (Mayer i in., 2012) oraz macicy ciężarnych krów (Karstrup i in., 2017). Stwierdzono, że mikrobiota jamy ustnej i jelit matki jest ściśle związana z mikrobiotą łożyska, a co za tym idzie, z mikrobiotą smółki, co sugeruje, że mikrobiota matczyzna może docierać do płodu przez macicę i naczynia krwionośne łożyska (Osorio, 2020). Oznaczało by to również, że układ immunologiczny cieląt jeszcze podczas ciąży, ma kontakt z tymi drobnoustrojami i nie jest całkowicie naiwny jak sądzono, ale aktywowane są już nabyte swoiste komórkowe

mechanizmy obronne. W jakim stopniu zaawansowania jest ta aktywacja, nie wiadomo (potrzeba dalszych badań), jednak wydaje się, że zastosowanie probiotyków jak wykazano w badaniach własnych, przyspiesza ten proces lub nawet go inicjuje.

Zastosowanie probiotyków u cieląt, już po ich urodzeniu prowadziło również do utrzymywania się stałej, wysokiej aktywności fagocytarnej i bójczej monocytów i neutrofilów u cieląt grupy doświadczalnej, a omawiane parametry były znacząco wyższe, w porównaniu do cieląt grupy kontrolnej, przez cały czas trwania doświadczenia. Utrzymywanie się wysokiego poziomu odporności u cieląt otrzymujących probiotyk w formie dodatku żywieniowego, można niewątpliwie wiązać z jego zastosowaniem. A podawane drobnoustroje probiotyczne mogą mieć działanie stymulujące na oceniane parametry układu immunologicznego cieląt. Trudno jest również odnieść się do tych wyników badań własnych, ponieważ, brak jest dostępnych publikacji dotyczących tego tematu u cieląt. Niemniej jednak stymulacja układu immunologicznego w zakresie aktywności komórek fagocytujących, przez szczepy probiotyczne u cieląt, może odbywać się w podobny sposób jak u dorosłych krów, co zostało już przedstawione we wcześniejszej części dyskusji. Jednak regulacja odpowiedzi immunologicznej i uruchomienie poszczególnych populacji leukocytów, różni się pomiędzy cielętami a krowami dorosłymi. U cieląt w porównaniu do ich matek, obserwuje się bardzo niskie wartości w procentowej zawartości limfocytów regulatorowych (Foxp3) oraz aktywowanych limfocytów B (CD25+), natomiast porównywalny odsetek pozostałych ocenianych leukocytów zwłaszcza limfocytów T wspomagających (CD4+) i cytotoksycznych/supresorowych (CD8+). Jest to zapewne wynikiem niedojrzałości układu immunologicznego cieląt u których istniejące wrodzone, głównie komórkowe mechanizmy obronne nie są w stanie skutecznie radzić sobie z ewentualną infekcją. Odporność nowo narodzonych cieląt opiera się przede wszystkim na biernie nabytych komórkowych a zwłaszcza humoralnych mechanizmach opartych na leukocytach oraz przeciwciałach, które są biernie wchłaniane z siary w pierwszych godzinach życia cielęcia (Chase i in., 2008). W badaniach własnych nie uwzględniono oceny poziomu przeciwciał, natomiast procesy adaptacyjne, miały bardzo ograniczoną aktywność w pierwszych 48 godzinach życia cieląt, jednak wraz z upływem czasu od chwili porodu, zaczęły się uaktywniać, z wyraźną przewagą w grupie cieląt otrzymujących probiotyk. U cieląt w grupie doświadczalnej przez cały czas trwania doświadczenia uzyskano istotnie wyższy odsetek limfocytów TCD4+, limfocytów BCD21+, aktywowanych limfocytów BCD25+ oraz integryn $\beta 2$ (CD18+) i αM (CD11b+), w porównaniu do cieląt grupy kontrolnej. Wyniki te mogą świadczyć o szybszej adaptacji

układu immunologicznego cieląt w grupie doświadczalnej, być może pod wpływem probiotyku. Natomiast procesy regulatorowe, biorąc pod uwagę bardzo niski % limfocytów Foxp3, praktycznie nie funkcjonowały u cieląt w obu badanych grupach, przez cały czas trwania doświadczenia. Być może u cieląt procesy regulatorowe, wymagają dłuższego czasu adaptacji po urodzeniu (nasze badania trwały do 120 dnia życia), lub też mogą opierać się na innych komórkach regulatorowych, bez udziału limfocytów Foxp3. Badania przedstawione przez Kampen i in. (2006) wskazują, że główny mechanizm regulatorowy u cieląt w pierwszych miesiącach życia może opierać się na limfocytach gamma-delta ($\gamma\delta$), które podobnie jak limfocyty Foxp3 u krów dorosłych, poprzez cytokiny przeciwzapalne oddziałują supresyjnie na komórki odpornościowe (Kampen i in., 2006; Chase i in., 2008). Poza bardzo niską ilością limfocytów regulatorowych u cieląt obserwowano również, niską proporcję limfocytów T wspomagających (CD4+) do limfocytów cytotoksycznych/supresorowych (CD8+). Ponadto obserwowano niski poziom aktywowanych limfocytów B (CD25+) w porównaniu do nieaktywowanych limfocytów B (CD21+). Obserwacje te mogą dodatkowo potwierdzać przewagę aktywności wrodzonych oraz biernie – nabytych (z siary) nieswoistych komórkowych mechanizmów obronnych u cieląt, na niekorzyść nabytych - czynnie, swoistych mechanizmów immunologicznych. Jednak zauważyć należy, że zarówno mechanizmy komórkowej odporności wrodzonej jak i adaptacyjnej u cieląt otrzymujących probiotyk, były na wyższym poziomie w porównaniu do cieląt żywionych bez probiotyków, przez cały czas trwania doświadczenia. Może to mieć istotne znaczenie dla utrzymania zdrowotności cieląt po porodzie.

Podsumowując, badania własne w pierwszym etapie, wykazały wzrost aktywności fagocytarnej i wewnątrzkomórkowej bójczości komórek fagocytujących w krwi obwodowej krów, po zastosowaniu probiotyków, jako dodatku żywieniowego. Ponadto, u tych krów, wykazano wzrost procentowego udziału limfocytów Foxp3, limfocytów wspomagających TCD4+, aktywowanych limfocytów BCD25+, integryn $\beta 2$ (CD18+) oraz αM (CD11b+). Wzrost aktywności fagocytów oraz wymienione powyżej zmiany w subpopulacjach leukocytów, przypuszczalnie są wynikiem uruchomienia procesów regulatorowych w układzie immunologicznym krów otrzymujących probiotyk, który umożliwił jednoczesne wykorzystanie zarówno mechanizmów komórkowych (wrodzonych i nabytych) a możliwe że i humoralnych. Może to oznaczać, że u krów po zastosowaniu probiotyku, aktywowane są odpowiednie mechanizmy niezbędne zarówno do likwidacji ewentualnego zagrożenia jak i jednoczesnej stabilizacji układu immunologicznego. Potwierdzeniem tego jest utrzymywanie

się stałego, niskiego poziomu surowiczego amyloidu A (SAA) przez cały czas trwania doświadczenia, u krów otrzymujących probiotyk. Dlatego też można założyć, że układ immunologiczny krów, u których stosowano probiotyk, był lepiej przygotowany do reakcji w przypadku zagrożenia chorobami infekcyjnymi oraz łatwiej adaptował się do zmian warunków w różnych okresach laktacji, szczególnie w okresie poporodowym. Dzięki temu zastosowanie probiotyków a szczególnie w okresie zasuszenia i wczesnej laktacji, może ograniczyć występowanie chorób infekcyjnych u krów mlecznych. Z badań własnych wynika również, że zastosowanie probiotyków u krów mlecznych podczas ciąży, ma stymulujący wpływ na układ immunologiczny urodzonych przez nie cieląt. Podobnie jak zastosowanie probiotyków, jako dodatku żywieniowego u cieląt już po ich urodzeniu, również wpływa stymulująco na ich układ immunologiczny, czego wyrazem są znacznie wyższe uzyskane wartości immunologiczne u cieląt otrzymujących probiotyk w porównaniu do cieląt, które żywiono bez dodatku probiotyku.

6. Wnioski

- Badania własne wykazały wzrost aktywności fagocytarnej i wewnątrzkomórkowej bójczości komórek fagocytujących w krwi obwodowej krów, po zastosowaniu probiotyków, jako dodatku żywieniowego.
- Wyższy procentowy udział limfocytów Foxp3, limfocytów wspomagających TCD4+, aktywowanych limfocytów BCD25+, integryn $\beta 2$ (CD18+) oraz αM (CD11b+) u krów po zastosowaniu probiotyku oraz wysoki poziom wymienionych parametrów utrzymujący się przez całe doświadczenie, świadczy o aktywacji i utrzymywaniu się procesów regulatorowych na znacznie wyższym poziomie u krów otrzymujących probiotyk w porównaniu do krów żywionych bez dodatku probiotyku.
- Aktywacja i sprawniejsze funkcjonowanie procesów regulatorowych w układzie immunologicznym krów otrzymujących probiotyk, umożliwił jednoczesne wykorzystanie komórkowych mechanizmów zarówno wrodzonych jak nabytych, przez cały czas trwania doświadczenia.
- Utrzymywanie się stałego, niskiego poziomu surowiczego amyloidu A (SAA) przez cały czas trwania doświadczenia, u krów otrzymujących probiotyk również świadczy o stabilizacji lub większej tolerancji układu immunologicznego w tej grupie krów.
- Badania własne wykazały, że zastosowanie probiotyków jako dodatków żywieniowych u krów, ma uzasadnienie w różnych okresach laktacji, ponieważ na każdym etapie doświadczenia, uzyskano istotnie wyższe wartości immunologiczne u krów, w grupie doświadczalnej w porównaniu do krów kontrolnych.
- Z przedstawionych wyników można również wnioskować, że układ immunologiczny krów, u których stosowano probiotyk, był lepiej przygotowany do reakcji w przypadku zagrożenia patogenami oraz łatwiej adaptował się do zmian warunków w różnych okresach laktacji, szczególnie w okresie poporodowym.
- Zastosowanie probiotyków u krów ciężarnych w okresie zaususzenia, ma również uzasadnienie w aspekcie odporności ich potomstwa, ponieważ u cieląt urodzonych przez krowy żywione z dodatkiem probiotyku, w 48 godzinie po ich urodzeniu, uzyskano wyższą aktywność fagocytarną i bójczą komórek fagocytujących oraz wyższe wartości immunologiczne (TCD4+, BCD25+, CD11+, CD18+) w porównaniu do cieląt grupy kontrolnej.
- Stosowanie probiotyków, jako dodatku żywieniowego u cieląt po ich urodzeniu, również ma uzasadnienie, ponieważ u cieląt otrzymujących probiotyk wykazano istotnie wyższą

aktywność fagocytarną i bójczą fagocytów oraz wyższy odsetek limfocytów TCD4+, BCD21+, BCD25+ oraz integryn β 2 (CD18+) i α M (CD11b+), przez cały czas trwania doświadczenia, w porównaniu do cieląt kontrolnych.

Literatura:

1. Aagaard K., Riehle K., Ma J., Segata N., Mistretta T.A., Coarfa C., Raza S., Rosenbaum S., Van den Veyver I., Milosavljevic A., Gevers D., Huttenhower C., Petrosino J., Versalovic J. 2012. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. PLoS ONE 7, e36466
2. Abu-Tarbush H.M., Al-Saiady M.Y., El-Din A.H.K. 1996. Evaluation of diet containing *lactobacilli* on performance, fecal coliform and *lactobacilli* of young dairy calves. Anim. Feed Sci. Technol. 57, 39-49.
3. Ahmed S.T., Islam M.M., Mun H.S., Sim H.J., Kim Y.J., Yang C.J. 2014. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. Poul. Sci. 93, 1963-1971.
4. Aleri J.W., Hine B.C., Pyman M.F., Mansell P.D., Wales W.J., Mallard B., Fisher A.D. 2016. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. Res. Vet. Sci. 108, 8–17
5. Alexopoulos C., Georgoulakis I.E., Tzivara A., Kritas S.K., Siochu A., Kyriakis S.C. 2004. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 88, 381-392.
6. Ametaj, B. N., Hosseinim, A., Odhiambo, J. F., Iqbal, S., Sharma, S., Deng, Q., Duun, S. M. 2011. Application of acute phase proteins for monitoring inflammatory states in cattle. In: Veas, F. (Ed.), Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases. Intech Europe, Croatia, pp. 299–354. ISBN 978-953-307-873-1
7. An B.K., Cho B.L., You S.J., Paik H.D., Chang H.I., Kim S.W., Kang C.W. 2008. Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived β -glucan and single-strain probiotics. Asian-Australas J. Anim. Sci. 21, 1027-1032.
8. Ardisson A.N., De La Cruz D.M., Davis-Richardson AG., Rechcigl K.T., Li N., Drew J.C. Murgas-Torrazza R., Sharma R., Hudak M.L., Triplett E.W., Neu J. 2014. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. PLoS ONE. 9, 1– 8.
9. Bachman K.C., M.L., Schairer. 2003. Invited Review: Bovine Studies on Optimal Lengths of Dry Periods. J. Dairy Sci. 86, 3027–3037.

10. Bai S.P., Wu A.M., Ding X.M., Lei Y., Bai J., Zhang K.Y., Chio J.S. 2013. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poul. Sci.* 92, 663-670.
11. Baintner K. 2007. Transmission of antibodies from mother to young: evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Vet Immunol Immunopathol.* 117, 153–61.
12. Barton M.D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 13, 279–299.
13. Bell A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73(9), 2804-2819.
14. Bobe G., Young J.W., Beitz D.C. 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3105–3124.
15. Bomba A., Nemcova R., Mudronova D., Guba P. 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci. Tech.* 13, 121-126.
16. Brodersen R., Bijlsma F., Gori K., Jensen K.T., Chen W., Dominguez J., Haverson K., Moore P.F, Saalmüller A., Sachs D., Slierendrecht W.J., Stokes C., Vainio O., Zuckermann F., Aasted B. 1998. Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 1–13.
17. Brodzki P., Kostro K., Brodzki A., Wawron W., Marczuk J., Kurek Ł. 2015a. Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum. *Theriogenology* 84, 11-18.
18. Brodzki P., Kostro K., Krakowski L., Marczuk J. 2015b. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Vet. Res. Commun.* 39, 143–149.
19. Buncic S., Sofos J. 2012. Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International*, vol. 45, nr 2, s. 641-655.
20. Burton J., Madsen S., Yao J., Sipkovsky S., Coussens P. 2000. An immunogenomics approach to understanding periparturient immunosuppression and mastitis susceptibility in dairy cows. *Acta Vet. Scand.* 42, 407–424.
21. Burton J., McBride B., Kennedy B., Burton J., Elsasser T., Woodward B. 1991. Serum

- immunoglobulin profiles of dairy cows chronically treated with recombinant bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* 74, 1589–1598.
22. Burton J.L., Kehrl M., Kapil S., Horst R.L. 1995. Regulation of L-selectin and CD18 on bo-vine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J. Leukoc. Biol.* 57, 317–325.
 23. Butler W.R., Smith R.D. 2014. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72, 767–783.
 24. Chase C.C.L., Hurley D.J., Reber A.J. 2008. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. *Vet. Clin. Food. Anim.* 24, 87–104
 25. Cho J.H., Zhao P.Y., Kim I.H. 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs: A Review. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 2127-2134.
 26. Clementi F., Aquilanti L. 2011. Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Anaerobe*, 17, 6, 394-398.
 27. Commane D.M., Shortt C.T., Silvi S., Cresci A., Hughes R.M., Rowland I.R. 2005, Effects of fermentation products of pro-and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon. *Nutr. Cancer* 51, 1, 102-109.
 28. Conrad M.L., Ferstl R., Teich R., Brand S., Blümer N., Yildirim A.O., Patrascan C.C., Hanuszkiewicz A., Akira S., Wagner H., Holst O., von Mutius E., Pfefferle P.I., Kirschning C.J., Garn H., Renz H. 2009. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *J. Exp. Med.* 206, 2869– 77.
 29. Colditz I.G. 2002. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. *Livest. Prod. Sci.* 75, 257–268.
 30. Daşkiran, M., Önel, A. G., Cengiz, Ö., Ünsal, H., Türkyılmaz, S., Tatlı, O., Sevim, Ö., 2012. Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time. *J. App. Poultry Res.* 21, 3, 612-622.
 31. Deng Q., Odhiambo J.F., Farooq U., Lam T., Dunn S.M., Ametaj B.N. 2015. Intravaginal lactic Acid bacteria modulated local and systemic immune responses and lowered the incidence of uterine infections in periparturient dairy cows. *PLoS One.* 10, e0124167.
 32. De Moreno de LeBlanc A., Maldonado Galdeano C., Chaves S. 2005. Oral

- administration of *L. casei* CRL 431 increases immunity in bronchus and mammary glands. *Biolife Ed.* ISSN 1721–727X. *Eur. J. Inflamm.* 3, 23–28.
33. Diez-Fraile A., Meyer E., Burvenich C. 2003. Sympathoadrenal and immune system activation during the periparturient period and their association with bovine coliform mastitis. A review. *Vet. Q.* 25, 31–44.
 34. Dobson H., Smith R.F., Royal M.D., Knight C.H., Sheldon I.M. 2007. The high producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 17–23. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00906.x
 35. Dogi C.A., Galdeano C.M., Perdigon G. 2008. Gut immune stimulation by nonpathogenic Gram (+) and Gram (–) bacteria. Comparison with a probiotic strain. *Cytokine.* 41, 223–231.
 36. Donoghue D.J., 2003. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poultry Science*, 82, 618-621.
 37. Dracley J.K., 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82:2259-2273.
 38. Drackley J.K., Dann H.M., Douglas N., Janovick Guretzky N.A., Litherland N.B., Underwood J.P., Looor J.J. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci.* 4, 323-344.
 39. Drackley J.K., Dann H.M., Douglas G.N., Guretzky N.A.J., Litherland N.B., Underwood J.P., Looor J.J. 2010. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci.* 4,323–344.
 40. Edelman G.M. 1973. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 180, 830–840.
 41. EFSA, 2010. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs, *EFSA Journal*, vol. 8, nr 4, Parma. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 02.03.2016]
 42. EFSA, 2011a. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain, *EFSA Journal*, vol. 9, nr 4, Parma. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 02.03.2016]

43. EFSA, 2011b. Scientific Report: Shiga toxin producing E.coli (STEC) O104:H4 outbreaks in Europe: Taking Stock. EFSA Journal, vol. 9, nr 10, 2390. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 03.03.2016]
44. Elenkov I.J., Chrousos G.P., 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966, 290–303.
45. Enemark J., 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Vet. J.* 176, 32–43.
46. Ellis J.A, Hassard L.E., Cortese V.S, Morley P.S. 1996. Effects of perinatal vaccination on humoral and cellular immune response in cows and young calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 393–400.
47. Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., Chapwanya A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 144, 60-71.
48. European Commission, 2012. Food: From farm to fork statistics. 2011 edition, Eurostat Pocketbooks, Eurostat, European Commission, Publication Office of the European Union, Luksemburg.
49. FAO/WHO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Kordoba, Argentyna.
50. Fernandez M.F., Boris S., Barbes C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 94, 449–455.
51. Ferretti P., Pasolli E., Tett A et al. 2018. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing Infant gut microbiome. *Cell Host Microbe* 24, 133–45.
52. Folligné B., Parayre S., Cheddani R., Famelart M.H., Madec M.N., Plé C., Breton J., Dewulf J., Jan G., Deutsch S.M. 2016. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. *Food Microbiol.* 53, 60–69.
53. Freeman M.E., Kanyicska B. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. (Cover story). *Physiol. Rev.* 80, 1523.
54. Fulton R.W., Briggs R.E., Payton M.E., et al. 2004. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia

- haemolytica and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* 22, 643–649.
55. Funkhouser L.J., Brodenstein S.R. 2013. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLoS Biol* 11:e1001631.
 56. Gelsinger S.L., Heinrichs A.J. 2017. A short review: the immune system of the dairy calf and the importance of colostrum IGG. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* 5, 104–107.
 57. Goff J.P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J. Dairy Sci.* 89, 1292–1301.
 58. Goff J.P., Horst R.L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260-1268.
 59. Gomez M., de Agüero S.C., Ganal-Vonarburg T.F et al. 2016. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* 351, 1296 –1302.
 60. Gourbeyre P., Denery S., Bodinier M. 2011. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J. Leukoc. Biol.* 89, 685–95.
 61. Graugnard D.E., Bionaz M., Trevisi E., Moyes K.M., Salak-Johnson J.L., Wallace R.L., Drackley J.K., Bertoni G., Loores J.J. 2012. Blood immunometabolic indices and polymorphonuclear neutrophil function in peripartum dairy cows are altered by level of dietary energy prepartum. *J. Dairy Sci.* 95, 1749–58.
 62. Grover S., Rashmi H.M., Srivastava A.K., Batish V.K. 2012. Probiotics for human health—new innovations and emerging trends. *Gut Pathogens* 4, 15.
 63. Grummer R.R., Rastani R.R. 2004. Why Reevaluate Dry Period Length? *J. Dairy Sci.* 87, 77-85
 64. Hammona, D.S., Evjena, I.M., Dhimana, T.R., Goff, J.P., Walters, J.L. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113, 21–29.
 65. Hu J., Nomura Y., Bashir A., Fernandez-Hernandez H., Itzkowitz S., Pei Z., Stone J., Loudon H., Peter I. 2013. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS ONE* 8: e78257.
 66. Hurley W.L., Theil P.K. 2011. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* 3, 442–474.
 67. Horst R., Jorgensen N. 1982. Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants. *J. Dairy Sci.* 65, 2332–2337.
 68. Ingvarstsen K.L., 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow:

- physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126, 175–213.
69. Ingvartsen K.L., Moyes K.M. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal* 7, 112–122.
 70. Ingvartsen K.L., Moyes K.M. 2015. Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. *Jpn. J. Vet. Res.* 63, 15–24.
 71. Ingvartsen K.L., Dewhurst R., Friggens N. 2003. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest. Prod. Sci.* 83, 277–308.
 72. Israel E.J, Patel V.K, Taylor S.F, Marshak-Rothstein A., Simister N.E. 1995. Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. *J. Immunol.* 154, 6246–6251.
 73. Jiang K., Cao S., Cui J.Z., Matsubara J.A. 2013. Immuno-modulatory effect of IFN-gamma in AMD and its role as a possible target for therapy. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2, 71–76.
 74. Jiménez E, Marín M.L., Martín R., Odriozola J.M., Olivares M., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 159, 187– 93.
 75. Jin L.Z., Ho Y.W., Abdullah N., Ali M.A., Jalaludin S. 1996. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 67–71.
 76. Kawakami S.I., Yamada T., Nakanishi N., Cai Y. 2011. Feeding of Lactic Acid Bacteria and Yeast Affects Fecal Flora of Holstein Calves. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 269-271.
 77. Kawakami S.I., Yamada T., Nakanishi N., Cai Y., Ishizaki H. 2010. Leukocyte phagocytic activity with or without probiotics in holstein calves. *Res. J. Biol. Sci.* 5, 13–16.
 78. Kacskovics I. 2004. Fc receptors in livestock species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 351–362.
 79. Kampen A.H., Olsen I., Tollersrud T., Storset A.K., Lund A. 2006. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113, 53–63.
 80. Karstrup C.C., Klitgaard K., Jensen T.K., Agerholm J.S., Pedersen H.G. 2017. Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology* 99,

41–7.

81. Kasprowicz D.J., Kohm A.P., Berton M.T., Chruscinski A.J., Sharpe A., Sanders V.M. 2000. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the β 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *J. Immunol.* 165, 680–690.
82. Keller D., Farmer S., McCartney A., Gibson G. 2010. *Bacillus coagulans* as a probiotic. *Food. Sci. Tech. Bull. Funct. Foods.* 7, 103–109.
83. Kimura K., Goff J.P., Kehrli Jr., M.E. 1999. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 2385–2392.
84. Kumar K.S., Sastry N., Polaki H., Mishra V. 2015. Colon cancer prevention through probiotics: an overview. *J. Cancer Sci. Ther.* 7, 81-92.
85. Larson B.L., Fox P. 1992. Immunoglobulins of the mammary secretions. *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins.* 2 edition. pp. 231–254.
86. Lemme-Dumit J.M., Polti M.A., Perdigón G., Galdeano C.M. 2018. Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality. *Benef. Microbes.* 9, 153–164.
87. Leiby J.S, McCormick K., Sherrill-mix S et al. 2018. Lack of detection of a human placenta microbiome in samples from preterm and term deliveries. *Microbiome* 6, 1–11.
88. Lewis G.S. 1997. Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 984–994.
89. Ley R.E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Ramey R.R., Bircher J.S., Schlegel M.L., Tucker T.A., Schrenzer M.D., Knight R., Gordon J.I. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647–1651.
90. Liebler-Tenorio E.M., Riedel-Caspari G., Pohlenz J.F. 2002. Uptake of colostral leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 85, 33–40.
91. Littledike E.T., Young J.W., Beitz D.C. 1981. Common metabolic diseases of cattle: keto-sis, milk fever, grass tetany, and downer cow complex. *J. Dairy Sci.* 64, 1465–1482.
92. Luan S., Duersteler M., Galbraith E.A., Cardoso F.C. 2015. Effects of direct-fed *Bacillus pumilus* 8G-134 on feed intake, milk yield, milk composition, feed conversion, and health condition of pre- and postpartum Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 98, 6423–6432.

93. Łopuszyńska-Rusek M., Bilik K. 2007. Tendencje w żywieniu wysoko wydajnych krów mlecznych w okresie zasuszenia. *Wiadomości Zootechniczne*. 4, 55-66.
94. Macmillan K., Lean I., Westwood C. 1996. The effects of lactation on the fertility of dairy cows. *Aust. Vet. J.* 73, 141–147.
95. Madan J.C., Salari R.C., Saxena D. Davidson L., O'Toole G.A., Moore J.H., Sogin M.L., Foster J.A., Edwards W.H., Palumbo P., Hibberd P.L. 2012. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal Ed.* 97, 456–462.
96. Madden K.S., Sanders V.M., Felten D.L. 1995. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 417–448.
97. Marchwińska K. 2016. Projektowanie dodatków paszowych z wykorzystaniem bakterii fermentacji mlekowej. Rozprawa doktorska. Poznań 2016.
98. Maldonado Galdeano C., Novotny Núñez I., de Moreno de LeBlanc A., et al. 2011. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a nonsevere protein-energy-malnutrition model in mice. *BMC Gastroenterol.* 11, 64
99. Maldonado Galdeano C., Cazorla S.I., Lemme Dumit J.M., Vélez E., Perdigon G. 2019. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Ann. Nutr. Metab.* 74, 115–124.
100. Mallard B.A., McBride B.W., Kehrl M.E., Coussens P.M. 2009. Bovine immunophysiology and genetics: a review of the research and career of Jeanne L. Burton. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 96–103.
101. Marczuk J., Brodzki P., Brodzki A., Kurek Ł. 2018. The concentration of free amino acids in blood serum of dairy cows with primary ketosis. *Polish J. Vet. Sci.* 21, 149 – 156.
102. Marnila P., Korhonen H. 2011. Milk|Colostrum. In: John, W.F. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, second ed. Academic Press, San Diego, pp. 591–597.
103. Martinez N., Risco C.A., Lima F.S., Bisinotto R.S., Greco L.F., Ribeiro E.S., Maunsell F., Galvão K., Santos J.E.P. 2012. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J. Dairy Sci.* 95, 7158–7172.
104. Martinez N., Sinedino L.D.P., Bisinotto R.S., Ribeiro E.S., Gomes G.C., Lima F.S.,

- Greco L.F., Risco C.A., Galvão K.N., Taylor-Rodriguez D., Driver J.P., Thatcher W.W., Santos J.E.P. 2014. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 874–887.
105. Mashek D.G., Beede D.K. 2001. Peripartum responses of dairy cows fed energy-dense diets for 3 or 6 weeks prepartum. *J. Dairy Sci.*, 84, 115-125.
106. Mathur S., Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 281-295.
107. Mayer M., Abenthum A., Matthes J.M., Kleeberger D., Ege M.J., Hölzel C., et al. 2012. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. *Vet. Microbiol.* 161, 179–85.
108. McArt J.A.A., Nydam D.V., Oetzel G.R. 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 95, 5056–5066.
109. McGuirk S.M., Collins M. 2004. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 20, 593–603.
110. Mookiah S., Sieo C.C., Ramasamy K., Abdullah N., Ho Y.W. 2014. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *J. Sci. Food Agric.* 94, 341-348.
111. Morrill K., Conrad E., Lago A., Campbell J., Quigley J., Tyler H. 2012. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. *J. Dairy Sci.* 95, 3997–4005.
112. Mostov K.E. 1994. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 63–84.
113. Mountzouris K.C., Tsirtsikos P., Kalamara E., Nitsch S., Schatzmayr G., Fegeros K. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities, *Poultry Sci.* 86, 309-317.
114. Muller L., Ellinger D. 1981. Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 64, 1727–1730.
115. Mulligan F.J., Doherty M.L. 2008. Production diseases of the transition cow. *Vet. J.* 176, 3–9.

116. Niba A., Beal J., Kudi A., Brooks P. 2009. Bacterial fermentation in the gastro-intestinal tract of non-ruminants: influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Trop. Anim. Health Prod.* 41, 1393-1407.
117. Nocek J.E., Kautz W.P. 2006. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 260–266.
118. Nocek J.E., Kautz W.P., Leedle J.A., Block E. 2003. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. *J. Dairy Sci.* 86, 331–335.
119. Nowak W., Jaśkowski J., Wylegała S. 2006. Wpływ żywienia w okresie przejściowym na rozród krów mlecznych. *Medycyna weter.* 62, 632-636.
120. Nyangahu D.D., Lennard K.S., Brown B.P. 2018. Disruption of maternal gut microbiota during gestation alters offspring microbiota and immunity. *Microbiome* 6, 1– 10.
121. Nyangahu D.D., Jaspan H.B. 2019. Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 47–56.
122. Oelschlaeger T.A. 2010. Mechanisms of probiotic actions –a review. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 57-62
123. Oltenacu P.A., Algers B. 2005. Selection for increased production and the welfare of dairy cows: are new breeding goals needed? *Ambio* 34, 311–315.
124. Oltenacu P.A., Broom D.M. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim. Welf.* 19, 39–49.
125. Osorio J.S. 2020. Gut health, stress and immunity in neonatal dairy calves: the host side of host-pathogen interactions. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11, 105.
126. Paibomesai M., Hussey B., Nino-Soto M., Mallard B.A. 2013. Effects of parturition and dexamethasone on DNA methylation patterns of IFN- γ and IL-4 promoters in CD4+ T-lymphocytes of Holstein dairy cows. *Can. J. Vet. Res.* 77, 54.
127. Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D, Zak J, Radomski K. 2005. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 11, 7661-7665.
128. Peng H., Wang J.Q., Kang H.Y., Dong S.H., Sun P., Bu D.P., Zhou L.Y. 2012. Effect of feeding *Bacillus subtilis* natto fermentation product on milk production and composition, blood metabolites and rumen fermentation in early lactation dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96, 506–512.

129. Petersen H.H., Nielsen J.P., Heegaard P.M.H. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163-87.
130. Petrof E.O., Kojima K., Ropeleski M.J., Musch M.W., Tao Y., De Simone C., Chang E.B. 2004. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 127, 1474–1487.
131. Piccinini R., Binda E., Belotti M., Casirani G., Zecconi A. 2004. The evaluation of nonspecific immune status of heifers in field conditions during the periparturient period. *Vet. Res.* 35, 539–550.
132. PrabhuDas M., Bonney E., Caron K et al. 2015. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nat. Immunol.* 16, 237– 43.
133. Preisler M., Weber P., Tempelman R., Erskine R., Hunt H., Burton J. 2000a. Glucocorticoid receptor expression profiles in mononuclear leukocytes of periparturient Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 83, 38–47.
134. Preisler M.T., Weber P.S., Tempelman R.J., Erskine R.J., Hunt H., Burton J.L. 2000b. Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. *Am. J. Vet. Res.* 61, 14–19.
135. Pritchett L.C., Gay C.C., Besser T.E., Hancock D.D. 1991. Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holsteincows. *J. Dairy Sci.* 74, 2336–2341.
136. Pryce J.E., Nielsen B.L., Veerkamp R.F., Simm G. 1999. Genotype and feeding system effects and interactions for health and fertility traits in dairy cattle. *Livest. Prod. Sci.* 57, 193–201.
137. Punetha M., Roy A.K., Ajithakumar H.M., Para I.A., Gupta D., Singh M., Bharati J. 2018. Immunomodulatory effects of probiotics and prilled fat supplementation on immune genes expression and lymphocyte proliferation of transition stage Karan Fries cows. *Vet. World* 11, 209–214.
138. Qadis A.Q., Goya S., Ikuta K., Yatusy M., Nakanishi A.S., Sato S. 2014. Effects of a Bacteria-Based Probiotic on Ruminant pH, Volatile Fatty Acids and Bacterial Flora of Holstein Calves. *Journal of Veterinary Medical Sciences*, 76, 877-885.
139. Rearte R, LeBlanc S.J., Corva S.G., de la Sota R.L., Lacau-Mengido I.M., Giuliadori M.J. 2018. Effect of milk production on reproductive performance in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 101, 7575-7584.

140. Reber A.J., Hippen A.R., Hurley D.J. 2005. Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1854–60.
141. Reber A.J., Lockwood A., Hippen A.R., et al. 2006. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109, 139–50.
142. Reddy J.N.R., Wilkie B.N., Borgs P., Mallard B.A. 2000. Cytokines in *Mycoplasma hyorhinis* - induced arthritis in pigs bred selectively for high and low immune responses. *Infect. Immun.* 68, 1150–1155.
143. Reddy P.R.K., Raju J., Redy A.N., Reddy P.P.R., Hyder I. 2016. Transition Period and its Successful Management in Dairy Cows. *Indian J. Natur. Sci.* 7, 11691-11699.
144. Reig M., Toldrá F. 2008. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Sci.*, 78, 60-67.
145. Rescigno M., Urbano M., Valzasina B. Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P., Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2, 361– 7.
146. Ribeiro E.S., Lima F.S., Greco L.F., Bisinotto R.S., Monteiro A.P.A., Favoreto M., Ayres H., Marsola R.S., Martinez N., Thatcher W.W., Santos J.E.P. 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J. Dairy Sci.* 96, 5682–5697.
147. Roche J.R., Friggens N.C., Kay J.K., Fisher M.W., Stafford K.J., Berry D.P. 2009. Invited re-view: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* 92, 5769–5801.
148. Romero-Barrios P., Hempen M., Messens W., Stella P., Hugas M. 2013. Quantitative microbiological risk assessment (QMRA) of food-borne zoonoses at the European level. *Food Control* 29, 343-349.
149. Sangild P.T. 2003. Uptake of colostrum immunoglobulins by the compromised newborn farmanimal. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 98, 105–22
150. Saulnier D.M., Spinler J.K., Gibson G.R., Versalovic J. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 135-141

151. Scalia D., Lacetera N., Bernabucci U., Demeyere K., Duchateau L., Burvenich C. 2006. In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *J. Dairy Sci.* 89, 147–154.
152. Schrezenmeir J., de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 361-364.
153. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.
154. Sheikhi A., Giti H., Heibor M.R., Jafarzadeh A., Shakerian M., Baharifar N., Niruzad F., Moghaddam A.S., Kokhaei P., Baghaeifar M. 2017. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* modulates the secretion of Th1/Th2 and Treg cellrelated Cytokines by PBMCs from patients with atopic dermatitis. *Drug. Res. (Stuttg).* 67, 724–729.
155. Sheldon I.M., Cronin J.G., Bromfield J.J. 2019. Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 361-384.
156. Shim Y.H., Ingale S.L., Kim J.S., Kim K.H., Seo D.K., Lee S.C., Kwon I.K. 2012. A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *Brit. Poult. Sci.* 53, 482-490.
157. Sichetti M., De Marco S., Pagiotti R., Traina G., Pietrella D. 2018. Antiinflammatory effect of multistrain probiotic formulation (*L. rhamnosus*, *B. lactis*, and *B. longum*). *Nutrition.* 53, 95–102.
158. Signorini M.L., Soto L.P., Zbrun M.V., Sequeira G.J., Rosmini M.R., Frizzo L.S. 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res. Vet. Sci.* 93, 250–258
159. Sordillo L.M., Contreras G., Aitken S.L. 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim. Health Res. Rev.* 10, 53–63.
160. Sordillo L.M., Mavangira V. 2014. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. *Anim. Prod. Sci.* 54, 1204-1214.
161. Ster C., Loisel M.C., Lacasse P. 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J. Dairy Sci.* 95, 708–717.
162. Stevenson M.A. 2000. Disease incidence in dairy herds in the southern highlands district

- of New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.* 43, 1–11.
163. Stout M.J., Conlon B., Landeau M et al. 2013. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 208, 226.
164. Suojala L., Orro T., Järvinen H., Saatsi J., Pyörälä S. 2008. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E.coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Vet. Scand.* 50, 18-28.
165. Suriyasathaporn W., Daemen A.J., Noordhuizen-Stassen E.N., Dieleman S. J., Nielen M., Schukken Y.H. 1999. Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68, 177–186.
166. Takeda S., Kawahara S., Hidaka M., Yoshida H., Watanabe W., Takeshita M., Kikuchi Y., Bumbein D., Muguruma M., Kurokawa M. 2013. Effects of oral administration of probiotics from mongolian dairy products on the Th1 immune response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1372–1378.
167. Tothova C.S., Nagy O., Seidel H., Kovac G. 2014. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Vet. Med.* 59, 163-80.
168. Trafalska E., Grzybowska K. 2004. Probiotyki - Alternatywa dla antybiotyków?. *Wiadomości Lekarskie*, 57, 491-498.
169. Trevisi E., Amadori M., Cogrossi S., Razzuoli E., Bertoni G. 2012 Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 93, 695–704.
170. Tucker H. 2000. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J. Dairy Sci.* 83, 874–884.
171. Tucker H.A. 1981. Physiological control of mammary growth, lactogenesis, and lactation. *J. Dairy Sci.* 64, 1403–1421.
172. Tuohy K.M., Rouzaud G.C.M., Bruc, W.M., Gibson G.R. 2005. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy. *Curr. Pharm. Des.* 11, 75-90.
173. Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ.* 30, 126-32.
174. Van Knegsel A.T., de Vries Reilingh G., Meulenberg S., van den Brand H., Dijkstra J., Kemp B., Parmentier H.K. 2007. Natural antibodies related to energy balance in early

- lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 5490–5498.
175. Vargová M., Hromada R., Laktičová K.V., Pošiváková T., Benculák J., Kováč G., 2017. Correlations between acute phase proteins and the body condition score. *Acta Vet. Brno* 86, 339–344.
 176. Vazquez-Terres A., Jones-Carson J., Bäumlér A.J., Falkow S., Valdivia R., Brown W., Le M., Berggren R., Parks W.T., Fang F.C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 401, 804– 8.
 177. Villalba J.J., Ates S., McAdam J.W. 2021. Non-fiber Carbohydrates in Forages and Their Influence on Beef Production Systems. *Front. Sustain. Food Syst.* 5, 1-12.
 178. Wan M.L., Forsythe S.J., El-Nezami H. 2018. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1–14.
 179. Wankhade P.R., Manimaran A., Kumaresan A., Jeyakumar S., Ramesha K.P., Sejian V., Rajendran D., Varghese M.R. 2017. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Vet. World* 10, 1367–1377.
 180. Wegener H.C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 439-445.
 181. Winnicka A. 2021. Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. Wyd VII. Wydawnictwo SGGW Warszawa. Warszawa 2021.
 182. Winnicki S., Jugowar J.L., Nawrocki L., Kalika G., Rudowicz-Nawrocka J. 2012. System TMR żywienia krów mlecznych w aspekcie zasad rolnictwa precyzyjnego. *Problemy Inżynierii Rolniczej.* 1, 77-85.
 183. Włodarczyk R., Budvytis M. 2011. Właściwe żywienie krów wysoko wydajnych – jak w pełni wykorzystać ich potencjał produkcyjny. *Życie Wet.* 86(10), 771-776.
 184. Yasui T., McCann K., Gilbert R.O., Nydam D.V., Overton T.R. 2014. Associations of cyto-logical endometritis with energy metabolism and inflammation during the periparturient period and early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 2763–2770.
 185. Yoo J.Y., Kim S.S. 2016. Probiotics and prebiotics: present status and future perspective on metabolic disorders. *Nutrients* 8, 173.
 186. Zerbe H., Schneider N., Leibold W., Wensing T., Kruij T., Schuberth H. 2000. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 54, 771–786.

Streszczenie

W hodowli bydła mlecznego dużym problemem jest występowanie chorób związanych z nieprawidłową funkcją układu odpornościowego. W ostatnim czasie zwraca się uwagę na zastosowanie probiotyków w celu poprawy funkcjonowania układu immunologicznego, nie jest jednak w pełni poznany wpływ podawania probiotyków na funkcję tego układu u krów mlecznych jak i u cieląt. Większość publikacji, głównie przeglądowych, jedynie potwierdza, że probiotyki działają stymulująco na odporność u tego gatunku zwierząt. Dlatego też celem badań była ocena wpływu probiotyków stosowanych w postaci dodatków żywieniowych na wybrane wskaźniki odporności u krów mlecznych w różnych okresach laktacji oraz ich potomstwa. Ponadto, celem badań była również ocena wpływu probiotyków stosowanych u ciężarnych krów przez 6 ostatnich tygodni ciąży (cały okres zasuszenia) na wybrane parametry odporności u urodzonych przez nie cieląt.

W pierwszym etapie badania przeprowadzono na 20 ciężarnych krowach. Zwierzęta podzielono na 2 grupy (każda po 10 krów). Grupa doświadczalna – krowy, u których stosowano preparat EM-Probiotyk, jako dodatek do karmy, przez okres od wytypowania krów przed zasuszeniem, do 12 tygodnia po porodzie (90 DPP). Grupę kontrolną stanowiły krowy, które żywiono bez dodatku probiotyku. W drugim etapie doświadczenia badaniem objęto 20 cieląt pochodzących od w/w krów. Grupę doświadczalną stanowiły cielęta (10szt.) pochodzące od krów grupy doświadczalnej, one podobnie otrzymywały do pokarmu preparat EM-Probiotyk od 3 do 120 dnia życia, natomiast cielęta (10szt.) pochodzące od krów grupy kontrolnej również stanowiły grupę kontrolną, żywione były bez dodatku probiotyku. Krew do badań od krów, pozyskiwano sześciokrotnie, pierwszy raz, w dniu wytypowania zwierząt - przed zasuszeniem, a następnie 14 dni przed porodem, 7 dni po porodzie, 21 dni po porodzie, 60 dni po porodzie oraz 90 dni po porodzie. U cieląt natomiast krew pobierano 48 godzin po urodzeniu, 21, 60 i 120 dni po urodzeniu cieląt.

Metodą cytometrii przepływowej oceniona została aktywność fagocytarna granulocytów i monocytów przy użyciu komercyjnego zestawu Phagotest oraz wewnątrzkomórkowa zdolność zabijania neutrofilii przy zastosowaniu zestawu Bursttest. Również przy pomocy cytometru przepływowego przeprowadzono immunofenotypowanie limfocytów. U wszystkich badanych zwierząt oceniono następujące receptory: CD4 (komórki pomocnicze T (Th)), CD8 (komórki T cytotoksyczne/supresorowe), CD11b (podjednostka receptora integriny α M), CD18 (podjednostka receptora integriny β 2), CD21 (limfocyty B), CD25 (łańcuch alfa receptora interleukiny 2) i Foxp3 (komórki T-regulatorowe).

Pomiary poziomu surowiczego amyloidu A (SAA) w surowicy krwi krów przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu ELISA.

Wyniki badań własnych w pierwszym etapie, wykazały wzrost aktywności fagocytarnej i wewnątrzkomórkowej bójczości komórek fagocytyjnych w krwi obwodowej krów, po zastosowaniu probiotyków. Ponadto, u tych krów, wykazano wzrost procentowego udziału limfocytów Foxp3, limfocytów wspomagających TCD4+, aktywowanych limfocytów BCD25+, integryn β 2 (CD18+) oraz α M (CD11b+). Wzrost aktywności fagocytów oraz wymienione zmiany w subpopulacjach leukocytów, przypuszczalnie są wynikiem uruchomienia procesów regulatorowych w układzie immunologicznym krów otrzymujących probiotyk, który umożliwił jednoczesne wykorzystanie zarówno mechanizmów komórkowych jak i humoralnych. Może to oznaczać, że u krów po zastosowaniu probiotyku, aktywowane są odpowiednie mechanizmy niezbędne zarówno do likwidacji ewentualnego zagrożenia jak i jednoczesnej stabilizacji układu immunologicznego. Potwierdzeniem tego jest utrzymywanie się stałego, niskiego poziomu surowiczego amyloidu A (SAA) przez cały czas trwania doświadczenia, u krów otrzymujących probiotyk. Dlatego też można założyć, że układ immunologiczny krów, u których stosowano probiotyk, był lepiej przygotowany do reakcji w przypadku zagrożenia oraz łatwiej adaptował się do zmian warunków w różnych okresach laktacji, szczególnie w okresie poporodowym. Dzięki temu zastosowanie probiotyków a szczególnie w okresie zasuszenia i wczesnej laktacji, może ograniczyć występowanie chorób infekcyjnych u krów mlecznych. Z badań własnych wynika również, że zastosowanie probiotyków u krów mlecznych podczas ciąży, ma stymulujący wpływ na układ immunologiczny urodzonych przez nie cieląt. Podobnie jak zastosowanie probiotyków u cieląt już po ich urodzeniu, u których uzyskano istotnie wyższy odsetek limfocytów TCD4+, limfocytów BCD21+, aktywowanych limfocytów BCD25+ oraz integryn β 2 (CD18+) i α M (CD11b+), w porównaniu do cieląt grupy kontrolnej. Wyniki te mogą świadczyć o szybszej adaptacji układu immunologicznego cieląt w grupie doświadczalnej, być może pod wpływem probiotyku. Natomiast procesy regulatorowe, biorąc pod uwagę bardzo niski % limfocytów Foxp3, praktycznie nie funkcjonowały u cieląt w obu badanych grupach, przez cały czas trwania doświadczenia.

Słowa kluczowe: krowy mleczne, cielęta, probiotyki, odporność komórkowa.

Summary

The prevalence of diseases related with disorders of the immune system, pose a serious problem in dairy cattle farming. Recently, in order to improve the functioning of the immune system, the attention has been drawn to the application of probiotics. However, the administration of probiotics and its effect on the immune system of dairy cows and calves, is not well understood. Most of publications, which are mostly review-ones, only confirm that probiotics have a stimulant effect on the immunity of this animal species. Therefore, the purpose of the conducted research was to investigate the impact of probiotics, applied as a nutritional-supplements, on selected indicators of the immune system of dairy cows in different lactation periods, and its influence on the immune-system of their descendants. Moreover, the experiment was also carried out to evaluate the impact of probiotic consumption on the immune system of offspring, which mothers were supplemented with probiotics during the last six weeks of their pregnancy (whole dry period).

The first step of the research was conducted on twenty pregnant cows. The animals were divided into two groups, of 10 cows each. The experimental group was represented by cows, which were fed with the addition of the “EM-Probiotyky” probiotic as a nutritional supplement, from the day of selection of each animal as a subject of the research before the dry period, up to twelve weeks after the parturition (90 DPP). The cows, which were not supplemented with probiotics, were observed as the control group. In the second step, twenty calves, descendants of the above-mentioned ones, were included in the experiment. The experimental group was consisted by ten calves, the offspring of cows which were representing the previously mentioned, experimental group. The animals included in this group also received the “EM-Probiotyky” with their feeds, from third, till the one-hundredth day of life, while calves which were the descendants of cows from the “Control Group”, determined the “Control Group” as well. There was no administration of probiotics in the feeds in this group of animals. The blood needed for the research was drawn six times. First time in the day of selection of the individuals to the experiment – before the dry period. Second time - 14 days before the parturition, then 7, 21, 60, 90 days after the parturition. The blood was obtained from the calves 48 hours after the birth, then 21, 60 and 120 days after. The phagocytic activity of granulocytes and monocytes was evaluated by the flow cytometry method with the use of the “Phagotest” commercial test kit. Immunophenotyping of the lymphocytes was done by using the flow cytometry as well. To examine the intracellular ability of killing of the neutrophils, the Bursttest test kit was employed. In all animals which

were taking part in the experiment, the following receptors were tested: CD 4 (T helper cells (TH)), CD 8 (T cytotoxic/suppressor cells), CD11b (integrin receptor subunit α M), CD 18 (integrin receptor subunit β 2), CD21 (lymphocytes B), CD25 (interleukin receptor alpha chain 2) and Foxp3 (T-regulatory cells). The measurements of the level of the serum amyloid A (SAA) in the blood serum of cows, were carried out using a commercial ELISA kit. The results showed an increase of the phagocytic activity and intracellular killing of phagocytic cells in the peripheral blood of cows after the use of probiotics in the first step of our own research. What's more, a percentage increase of Foxp3 lymphocytes, TCD4+ helper lymphocytes, activated BCD25+ lymphocytes, β 2 (CD18+) and α M (CD11b+) integrins was also observed in this group of animals. The increase of the activity of the phagocytes and above - mentioned changes in the leukocyte subpopulations are probably the results of the activation of the regulatory processes in the immune system of cows which were fed with the addition of the probiotics, which enabled the simultaneous use of both cellular and humoral mechanisms of the immune – response. Because of that, a conclusion can be drawn - after the administration of probiotics, appropriate and necessary to eliminate a possible danger, and to stabilize the immune system mechanisms are activated, what can be confirmed by the fact that in bodies of the cows which were receiving the probiotic, the level of serum amyloid A (SAA) was persistently low throughout the whole experiment. Therefore, it can be assumed that the immune system of cows fed with an addition of the probiotics was better prepared to react in the event of a possible danger and more easily adapted to changes of conditions in different periods of lactation, especially in the postpartum period. Thanks to it, the application of probiotics, especially during the dry period and early lactation, can reduce the occurrence of infectious diseases in dairy cows. Own researches also show, that the use of probiotics in nutrition of dairy cows during their pregnancy has a stimulating effect on the immune system of their offspring. Similarly, calves which received a probiotic after the birth, had a significantly higher percentage of TCD4+ lymphocytes, BCD21+ lymphocytes, activated BCD25+ lymphocytes and β 2 (CD18+) and α M (CD11b+) integrins, compared to the calves of the control group. Based on these results, it can be concluded that the immune system of calves from the experimental group adapts faster, perhaps because of the probiotic supplementation. Whereas, given that the percentage of Foxp3 lymphocytes was very low, the regulatory processes practically did not function in calves of both groups for the entire duration of the experiment.

Key words: dairy cows, calves, probiotics, cellular immunity.