

Таблиця 5 – Жива маса, енергія росту і збереженість дослідних телят, (M ± m, n=5)

Показники	Вік телят, діб			
	При народженні	30	60	90
Жива маса, кг	25,6±1,2	38,4±1,4	53,1±1,8	68,5±2,2
	25,1±0,9	40,3±1,1*	56,5±2,0*	74,2±1,8*
Середньо-добовий приріст, г		426,0±3,1	490,0±5,2	512,0±3,4
		506,0±4,0*	534,0±4,1*	596,0±4,0*
Абсолютний приріст, кг		12,8±0,8	14,7 ±0,2	15,4±0,4
		15,2±0,5	16,0 ±0,2	17,9±0,2
Збереженість, %	100	93,6	91,6	90,2
	100	98,4	98,4	98,4

Примітка: у чисельнику показники контрольної групи, знаменнику – дослідної; * – p≤0.05 у відношенні до контролю

Висновок. Біокоректор Комплексний металоглобулін (КМГ) має імуностимулюючу активність, сприяє збереженню гомеостазу організму та нормального фізіологічного стану молодняка великої рогатої худоби. Введення телятам КМГ після народження в дозі 0,5 мл/кг живої ваги 3 рази на добу сприяє інтенсивності росту, високому рівню збереження поголів'я, підвищенню клітинних і гуморальних показників неспецифічної резистентності організму телят, підвищенню безпеки на 4,8–8,2 %. Вирощування телят без застосування біостимуляторів є неефективним, особливо за умов мікроклімату, який не відповідає параметрам, передбаченим ВНТП-АПК-01.-05 (Скотарські підприємства).

Список літератури

- Гігієна тварин [Текст] : підруч. / М.В. Демчук [та ін.]. – 2-е вид. – Х. : Еспада, 2006. – 520 с. 2. Медведський, В.А. Вікова та сезонна динаміка природної резистентності організму поросят і її корекція ентерофаром [Текст] : рек. / В.А. Медведський. – Вітебськ, 2001. – С. 13. 3. Садомов, Н.А. Ефективність використання кормових добавок СФДК-3 в раціоне молодняка крупного рогатого скота [Текст] / Н.А. Садомов, М.В. Шупик // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. Белорус. ГСХА. – Z-1-Горки, 2012. – Вып. 15. – С. 299–308. 4. Панихина, А.В. Иммунорекорекция организма бычков новыми биопрепаратами [Текст] / А.В. Панихина, А.А. Шуканов, В.И. Лашенков // Современные проблемы вет. диетологии и нутрициологии : материалы междунар. симп., 22-24 апр. 2003. – СПб., 2003. – С. 124–126. 5. Warner, C. Genetik contral oху immune responsiveness: a review the use as a tool selection disease resistance [Text] / C. Warner, D. Macker // J. Animal Sc. – 1992. – Vol. 64, № 2. – P. 394–406.

EFFECT OF IMMUNOSTIMULANT KMG ON RESISTANCE AND THE PRESERVATION OF CALVES

Garkusha I.V., Golovko V.O.

Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkiv

An immune complex metaloglobulin contains 100 ml of 10 ml immunostimulant at 0,02% - FeSO₄, CoSO₄, CuSO₄, by 0,002% - MnCl₂ and ZnSO₄. Intramuscular administration of calves KMG a dose of 0.5 ml / kg body weight contributed to the stimulation of humoral and cellular factors of protection of natural resistance, the increase in average daily gain and reduce disease calves.

УДК 619:573.6:57.086.13:615.387:636.7

РОЗРОБКА ПАРАМЕТРІВ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ СОБАКИ

Гонтаренко А.О., Стегній Б.Т., Фісенко С.А., Кузнєцов Є.П., Келеберда М.І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Стовбурові клітини – це особливий тип клітин живих організмів, кожна з яких здатна до диференціації та трансформації в спеціалізовані клітини організму. Кордова (плацентарна, пуповина, фетальна) кров (КК) є повноцінним джерелом гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) на рівні з кістковим мозком, фетальною печінкою та жировою тканиною [1, 2]. Як внутрішнє середовище зростаючого організму, кордова кров (КК) забезпечує доставку біологічно активних речовин, що продукуються плацентою та фетальними тканинами, до всіх тканин і органів плоду. Гемопоетичні стовбурові клітини що містяться в КК здатні до самовідновлення, проліферації, диференціації та є попередниками всіх типів клітин крові. Трансплантація ГСК може бути використана при лікуванні порушень з боку імунної системи. Завдяки своїм властивостям стовбурові клітини в організмі реципієнта виконують функцію імунотуляції та відновлюють гемопоез [4], приймають участь у регенерації та відновленні ушкоджених тканин та органів, що значно підвищує загальну ефективність процедури трансплантації в терапії тяжких патологічних станів. Клітини кордової крові мають певні переваги в порівнянні з аналогічними клітинами кісткового мозку дорослого організму, вони є молодшими і саме тому мають багато вищий проліферативний потенціал і низьку імуногенність [2].

На сьогоднішній день кріоконсервування є безальтернативним способом довгострокового зберігання ГСК у життєздатному стані [3]. Необхідність використання ультранизьких температур пояснюється тим, що за таких умов у клітинах практично повністю припиняються всі біохімічні реакції, проте процес замороження та розмороження негативно впливає на життєздатність та функціональну активність клітин. Основними причинами цього є утворення кристалів льоду, що руйнують клітини. Використання кріопротекторів під час консервування клітин за низьких температур дозволяє попередити розвиток негативних процесів і забезпечити збереженість клітин у життєздатному стані після замороження [6]. Але підбір кріозахисного середовища для якісного збереження біологічного матеріалу в умовах ультранизьких температур необхідно проводити індивідуально для всіх об'єктів кріоконсервування. Для досягнення даної мети у кожному випадку необхідно проводити визначення життєздатності та функціональних властивостей конкретного об'єкту, що буде підлягати замороженню та встановлювати ці показники після розмороження. Це дозволить визначити ефективність обраного кріопротектора для даного об'єкту [5]. У сучасній практиці для зберігання ГСК широко використовуються

кріозахисні середовища на основі речовини ендоцелюлярної дії, диметилсульфоксиду (ДМСО) і кріопротектори екзоцелюлярної дії, такі як поліетиленоксид (ПЕО) і полівінілпірролідон (ПВП).

Саме тому метою досліджу було відпрацювати та підібрати ефективні протоколи кріоконсервування, розробити метод довгострокового зберігання ядерних клітин КК собаки, а також оцінити показники їх структурно-функціональної повноцінності та життєздатності.

Матеріали та методи досліджень. Кордову кров отримували з плаценти та пуповини плоду після проведення кесаревого розтину сук на останніх строках вагітності. Кров відбирали закритим шляхом за допомогою стерильного шприцу з додаванням антикоагулянту CPD (цитратно-фосфатно-декстрозний розчин). Середній об'єм отриманої КК складав 70±20 см³.

Зібрану КК собаки розділяли на лейкоцитарну та еритроцитарну фракції шляхом седиментації з розчином поліглюкіну, який додавали у співвідношенні 1:1.

Результат кріоконсервування залежить від правильного підбору кріопротектора, від часу контакту з ним і режиму заморожування. Було досліджено ефективність кріоконсервування клітин КК собаки під захистом наступних кріозахисних середовищ: кріосередовище № 1 містить ПВП з молекулярною масою 12600 в концентрації 18 %. До складу кріосередовища № 2 входить ДМСО 10 % та 20 % аутологічної сироватки. Кріосередовище № 3 містить ПЕО з молекулярною масою 1500 в концентрації 30 %. Готові розчини кріопротекторів додавали до суспензії ЯК КК собаки краплями при постійному обережному перемішуванні у співвідношенні 1:1. Суміш суспензії клітин з кріосередовищем заморожували у кріопробірках фірми NUNC об'ємом 1,5 та 4,8 см³.

Заморожування клітин проводили з використанням контрольованого заморожування за наступними програмами: № 1 – зі швидкістю 1 °С/хв. до мінус 30 °С, потім зі швидкістю 5 °С/хв. до мінус 100 °С, потім кріопробірки занурювали у рідкий азот; № 2 – зі швидкістю 1 °С/хв. до мінус 20 °С, потім – швидко занурювання у рідкий азот; № 3 – до мінус 20 °С зі швидкістю 1 °С/хв., потім зі швидкістю 10 °С/хв. до мінус 80 °С з послідовним занурюванням у рідкий азот. Отримані зразки клітин КК собаки зберігалися у рідкому азоті (при мінус 196 °С).

Розморожування зразків КК собаки проводили на водяній бані за температури (37–41) °С, до повного переходу зразків у рідку фазу.

Для вивчення впливу кріопротекторів на ЯК КК собаки та визначення ефективності кріоконсервування, вивчали показники структурно-функціональної повноцінності клітин як на етапі їх підготовки до кріоконсервування, так і після розморожування суспензії клітин КК собаки. Життєздатність клітин визначали за допомогою методу вітального фарбування розчином трипанового синього (ушкоджені клітини мали блакитне забарвлення ядра та цитоплазми). Концентрацію ядерних клітин підраховували в камері Горяєва за загально прийнятою методикою. Визначення фагоцитарної активності ядерних клітин проводили після їх інкубації з культурою *Staphylococcus aureus*. Завись лейкоцитів змішували із інактивованою за допомогою нагрівання культурою *Staphylococcus aureus* у пропорції 1:2 та концентрацією 1 млрд мікробних тіл на 1 см³, інкубували за температури 37 °С упродовж 30 хв. Після інкубації суміш центрифугували, насад відбирали, а з отриманого осаду робили мазки та фарбували за Романовським-Гімзе. Мікроскопія мазків проводилася з підрахунком кількості фагоцитуючих і нефагоцитуючих клітин на 200 підрахованих.

Результати досліджень. З метою вивчення ефективності кріоконсервування клітин КК собаки необхідним етапом проведених досліджень було визначення оптимальних умов адаптації клітин КК собаки до дії низьких температур. Використання кріопротекторів пояснюється їх властивістю запобігати дії руйнівних факторів у процесі охолодження, пов'язаних з утворенням зовнішньої та внутрішньоклітинних кристалів льоду. Проте, надмірний вплив самого кріопротектору також може приводити до пошкодження клітин вже на етапі їх підготовки до заморожування. З цією метою було визначено вплив кріопротекторів на морфофункціональні властивості клітин кордової крові собак при експозиції впродовж 15, 30 та 60 хвилин. (табл. 1).

Таблиця 1 – Вплив кріопротекторів ДМСО, низькомолекулярного ПВП та ПЕО на життєздатність ядерних клітин КК собаки (n=15)

Кріосередовище що використовували	Життєздатність клітин (%)			
	До внесення кріопротектора	Експозиція з кріосередовищем		
		15 хв	30 хв	60 хв
№1 (ПВП)	98,2±1,9	97,8±1,7	97,4±1,6	96,6±1,6
№2 (ДМСО)	98,2±1,9	97,4±1,4	92,7±2,1	89,3±1,6
№3 (ПЕО)	98,2±1,9	97,1±1,3	96,8±1,8	93,7±2,2

З даних таблиці видно, що під час експозиції ядерних клітин з кріосередовищем № 1, упродовж усього терміну спостереження, суттєвого зниження показників життєздатності клітин КК не спостерігалось. Експозиція клітин з кріосередовищем № 3 терміном до 30 хв. також значно не впливала на життєздатність клітин, але збільшення часу експозиції до 60 хв. знижувало їх життєздатність до 6 %. Під час експозиції з кріосередовищем № 2 більше ніж 15 хв. спостерігалось значне зменшення життєздатності клітин, а саме інкубація впродовж 30 хв. зменшувала їх життєздатність до 5 %, збільшення часу інкубації до 60 хв. зменшувало життєздатність клітин на 7–13 %.

З метою оцінки функціонального стану об'єкту кріоконсервування на етапах отримання, підготовки до кріоконсервування та для подальшого дослідження збереженості цих функцій після кріоконсервування було досліджено фагоцитарну активність ядерних клітин КК собаки (табл. 2).

Таблиця 2 – Показники фагоцитарної активності лейкоцитарного концентрату клітин кордової крові (КК) під впливом кріопротекторів ПЕО, ПВП та ДМСО

Кріозахисне середовище	До введення кріопротектору		Після експозиції з кріопротектором					
			Через 15 хв.		Через 30 хв.		Через 60 хв.	
	Фагоцит. активність, %	Фагоцитар. число	Фагоцит. активність, %	Фагоцитар. число	Фагоцит. активність, %	Фагоцитар. число	Фагоцит. активність, %	Фагоцитар. число
№1 (ПВП)	46,4	3,5	45,7	3,3	44,9	3,0	41,4	3,0
№2 (ДМСО)	46,4	3,5	43,9	3,2	38,0	2,6	34,3	1,9
№ 3 (ПЕО-1500)	46,4	3,5	44,8	3,4	41,8	2,1	38,3	2,3

У процесі досліджень було встановлено, що кріопротектори ПЕО в кінцевій концентрації 15 % у складі кріосередовища № 3 та ПВП 9 % у кінцевій концентрації у складі кріосередовища № 1 не сприяли значному зниженню фагоцитарної активності ЯК кордо-

вої крові при інкубуванні до 30 хвилин. Проте експозиція клітин упродовж 30–60 хвилин з кріопротекторами ПЕО та ПВП негативно впливали на фагоцитарну активність клітин КК. Таким чином середні показники фагоцитарної активності знижувалися з 46,4 % до 41,4 % і 38,3 %, відповідно. При експозиції КК з кріосередовищем № 2, що містить ДМСО в кінцевій концентрації 5 % упродовж 15 хвилин середні показники фагоцитарної активності клітин знизилися з 46,4 % до 43,9 %, збільшення часу експозиції понад 15 хвилин приводило до зниження фагоцитарної активності клітин до 14 %.

Збереженість клітин і стан їх мембран є основними загальними показниками, які необхідно враховувати у процесі створення оптимальних параметрів кріоконсервування такого об'єкту, як клітини КК собаки. При розробці ефективної технології кріоконсервування необхідно враховувати вплив негативних факторів на клітини у процесі заморожування, саме тому при дослідженнях етапу кріоконсервування було вивчено вплив режимів заморожування.

При порівняльній оцінці було встановлено, що найбільшу збереженість клітинних елементів забезпечувало використання дослідних кріопротекторів у поєднанні з наступними поетапними програми заморожування: під захистом ДМСО та програмою заморожування: охолодження зі швидкістю 1 °С/хв. до мінус 30 °С, потім зі швидкістю 5 °С/хв. до мінус 100 °С, після чого занурювання у рідкий азот. Такий режим дозволяв зберігати до 93 % клітин КК з життєздатністю 87,2 %. При заморожуванні КК під захистом кріопротектору ПЕО, оптимальною була програма: зі швидкістю 1 °С/хв. до мінус 20 °С, потім швидке занурювання у рідкий азот, збереженість клітин була на рівні 89 %, а життєздатність клітин після розморожування – 84,7 %. При використанні ПВП у складі кріозахисного середовища найбільш оптимальною була триетапна програма замороження: охолодження до мінус 20 °С зі швидкістю 1 °С/хв., потім зі швидкістю 10 °С/хв. до мінус 100 °С з послідовним занурюванням у рідкий азот, даний режим забезпечував збереженість клітин до 76 % та життєздатність 78,1 %.

Висновки. Відпрацьовано методику відбору КК з плаценти та пуповини плоду при кесаревому розтині суки на останніх строках вагітності. Аналіз особливостей фракціонування кордової крові собак показав, що метод прискореної седиментації з використанням розчину поліглюкіну дозволяє отримувати до 87 % ядерних клітин та не впливає на показники їх життєздатності.

За результатами проведених досліджень встановлено, що використання різних за складом і впливом на клітини кріозахисних середовищ, потребує індивідуального режиму еквілібрації клітин з конкретним кріосередовищем на етапах підготовки та адаптації клітин КК собаки до кріоконсервування. А саме: експозиція з кріозахисним середовищем до складу якого входить ДМСО в концентрації 10 % не повинна перевищувати 15 хв., експозиція з кріопротектором ПЕО не повинна перевищувати 30 хв. Збільшення вказаного часу експозиції з даними кріопротекторами негативно впливає на показники життєздатності та фагоцитарної активності клітин КК собаки. Не відбувається зниження життєздатності клітин КК під час експозиції з кріопротектором ПВП упродовж усього часу спостереження, але експозиція впродовж 30–60 хв. негативно впливає на показники фагоцитарної активності.

При вивченні збереженості та життєздатності кріоконсервованих клітин КК собаки встановлено, що використання кріопротектора ДМСО в концентрації 10 % в поєднанні з програмою заморожування № 1 та кріопротектора ПЕО (мм 1500) у концентрації 30 % із замороженням за програмою № 2 забезпечує високі показники збереженості та життєздатності клітин, що дозволяє ефективно використовувати дані методи кріоконсервування для довгострокового зберігання такого біологічного об'єкту як ЯК КК собаки (в тому числі гемопоетичні).

Список літератури

1. Властивості і перспективи використання кордової крові в клінічній практиці [Текст] / О. К. Гулевський [та ін.] // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2005. – №1 (5). – С. 5–14.
2. Кріоконсервирование гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови для клинической практики [Текст] / Л.А. Бабийчук [и др.] // Вестн. неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 19–22.
3. Кріоконсервирование стволовых клеток [Текст] / В.И. Грищенко [и др.] // Досягнення біології та медицини. – 2006. – № 1. – С. 4–9.
4. Янченко, В. В. Стволовые клетки и их клиническое применение [Текст] / В.В. Янченко, А.В. Янченко, Д.К. Новиков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2005. – № 3. – С. 6–12.
5. Фундаментальные и клинические аспекты клеточной терапии [Текст] / В.И. Грищенко // Doctor. – 2004. – № 4. – С. 5–9.
6. Усс, А.Л. Кріоконсервирование клеток человека [Текст] / А.Л. Усс, П.Б. Мицкевич, И.Л. Завгородняя // Мед. панорама. – 2003. – № 2 (27). – С. 38–40.

DESIGN PARAMETERS FOR LONG-TERM STORAGE OF CORD BLOOD CELLS OF DOG.

Gontarenko A.O., Stegnyy B.T., Fisenko S.A., Kuznetsov Ye.P., Keleberda M.I.

National Scientific Centre "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Cord blood is a source of hematopoietic stem cells. Effective use of cord blood cell transplantation in clinical practice of veterinary medicine requires knowledge of getting, determining the formulation, clearly spent a low-temperature preservation methods for preservation of structural – functional usefulness cells after thawing. The aim of this study was to investigate the influence of cryoprotectants on the viability and functional status of cells in preparation for cryopreservation and establishing effective methods for cryopreservation and storage of nuclear cells from cord blood dog.

On the basis of these studies it was studied the effect of cryoprotectants exocellular-and endocellular and effect on the morphological properties of cord blood cells of dogs. It was established the effectiveness of cryopreservation nuclear cells from cord blood dogs, methods based on the use of cryoprotectants dimethyl sulfoxide, polyethylene oxide and low molecular polyvinylpyrrolidone.