View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується дослідження гормонального фону кішок імуноферментним методом до і після задавання контрацептивних препаратів. Дослідження в цьому напрямку плануються і для інших свійських тварин.

Література

1. Болдырева Е. М. Пиометра у собак и кошек / Е. М. Болдырева, С. А. Минаева / Метер. 10–го Московского Международного ветеринарного конгресса. М., 2002. 29–34 с.
2. Мануилова И. А. Современные контрацептивные средства / М.: Научно–практическое издание. Изд. 2е переработанное и дополненное, – 1993. – 200 с.
3. Симпсон Дж. и др. Руководство по репродукции и неонатологии собак и кошек. М.: Софион. – 2005. – С. 229.
4. Clinical Use of Progestins in Bitches and Queens: A Review / S. Romagnoli and P. W. Concannon / www.ivis.org., 2013 – 1–21 p.
5. Chatdarong K, Rungsipipat A, Axnér E et al. / Hysterographic appearance and uterinehistology at different stages of the reproductive cycle and alter progestagen treatment in the domestic cat. – Theriogenology, 2014 – 12–29 p.

References

Boldyreva, E. M., Minaeva, S. A. (2002). Piometra u sobak i koshek / Meter. 10–go Moskovskogo Mezhdunarodnogo veterinarnogo kongressa. M., 29–34. (in Russian).
Manuilova, I. A. (1993) Sovremennye kontraceptivnye sredstva – M.: Nauchno–prakticheskoe izdanie. Izd. 2e pererabotannoe i dopolnennoe, 200. (in Russian).
Simpson Dzh. i dr. (2005). Rukovodstvo po reprodukcii i neonatologii sobak i koshek. M.: Sofion. 229. (in Russian).
Romagnoli, S., Concannon, P. W. (2013). Clinical Use of Progestins in Bitches and Queens: A Review / www.ivis.org., 1–21.
Chatdarong, K, Rungsipipat, A, Axnér E et al. (2014). Hysterographic appearance and uterinehistology at different stages of the reproductive cycle and alter progestagen treatment in the domestic cat. – Theriogenology, 12–29.

Стаття надійшла до редакції 25.03.2016

УДК 636.7:612.419:57.086.13

Водоп'янова Л. А., к. б. н., доцент (vodopyanova2211@i.ua)
Бобрицька О. М., к. вет. н., доцент, **Югай К. Д.,** к. вет. н., доцент,
Жукова І. О., д. вет. н., професор ©
Харківська державна зооветеринарна академія, Харків, Україна

РОЗРОБКА МЕТОДУ ТА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ СОБАК

Відомо, що в замороженому стані біооб'єкти зберігаються тривалий час. Процес консервування кісткового мозку без застосування кріозахисту є дуже несприятливим для клітин, це зумовлює застосування кріопротекторів при заморожуванні. Дія кріопротекторів знижує негативні наслідки заморожування–відігріву та зберігає клітини до проведення трансплантації. До того ж неправильно підібраний кріопротектор може негативно впливати на збереженість і рівень енергетичних процесів у клітинах. Досліджували вплив кріопротекторів та заморожування–відігріву на структурно–морфологічний стан кісткового мозку собак. Використовували кінцеві концентрації розчинів кріопротекторів: ДМСО – 10 %, 7 %, 5 %, ПЕО–400 – 10 %, 15 %, 20 %, гліцерин – 10 %, 20 %, 30 %. Отримані результати вказують на те, що 7 % ДМСО є найбільш ефективним кріопротектором для більшості видів клітин кісткового мозку собак, особливо для клітин на ранніх стадіях диференціації. При застосуванні ДМСО зберігається більш 80 % клітин кісткового мозку собак. ПЕО–400 здатний зберігати клітини під час кріоконсервування, але на заключних стадіях процесу кількість клітин значно скорочувалась. Гліцерин, у всіх

© Водоп'янова Л. А., Бобрицька О. М., Югай К. Д., Жукова І. О., 2016

досліджених концентраціях, виявився найменш ефективним кріопротектором з досліджених.

Ключові слова: *клітини кісткового мозку, збереження клітин, кріоконсервування, кріопротектори, життєздатність клітин, ДМСО, гліцерол, поліетиленоксид.*

УДК 636.7:612.419:57.086.13

Водопьянова Л. А., к. б. н., доцент,
Бобрицкая О. Н., к. вет. н., доцент, **Югай К. Д.,** к. вет. н., доцент,
Жукова И. А., д. вет. н., профессор
Харьковская государственная зооветеринарная академия, Харков, Украина

РАЗРАБОТКА МЕТОДА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОЛГОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СОБАК

Известно, что в замороженном состоянии биообъекты сохраняются продолжительное время. Процесс криоконсервирования костного мозга без использования криозащиты является очень неблагоприятным для клеток, это обуславливает применение криопротекторов при замораживании. Действие криопротекторов снижает нежелательные последствия замораживания–отогрева и сохраняет клетки до проведения трансплантации, но неправильно подобранный криопротектор может негативно влиять на сохранность и уровень энергетических процессов в клетках. Исследовали влияние криопротекторов и замораживания–отогрева на структурно–морфологическое состояние костного мозга собак. Использовали следующие конечные концентрации криопротекторов: ДМСО 10 %, 7 %, 5 %, ПЕО–400 – 10 %, 15 %, 20 %, глицерин – 10 %, 20 %, 30 %. Полученные результаты характеризуют 7 % ДМСО как наиболее эффективный криопротектор для большинства видов клеток костного мозга собак, особенно для клеток на ранних стадиях дифференциации. При использовании ДМСО сохраняется более 80 % клеток костного мозга собак. ПЕО–400 способен сохранять клетки в процессе криоконсервирования, однако на заключительных стадиях процесса количество клеток значительно сокращается. Глицерин, в исследованных концентрациях, оказался менее эффективным из числа исследованных криопротекторов.

Ключевые слова: *клетки костного мозга, сохранность клеток, криоконсервирование, криопротекторы, жизнеспособность клеток, ДМСО, глицерин, полиэтиленоксид.*

UDC 636.7:612.419:57.086.13

Vodopyanova L. A., PhD, associate professor, lecturer,
Bobrytska O. M., PhD, associate professor, lecturer,
Yugay K. D. PhD, associate professor, lecturer,
Zhukova I. O., doctor of veterinary science, Professor
Kharkiv state zooveterinary academy, Kharkov, Ukraine

DEVELOPMENT OF METHODS AND EVALUATION OF LONG–TERM STORAGE OF DOG'S BONE MARROW CELLS

It is known that the biological objects are stored frozen for a long time. The process of bone marrow cryopreservation without cryoprotectants is very unfavorable for the cells, it causes the use of cryoprotectants during freezing. Action cryoprotectants reduce the negative effects of freezing and thawing, and stores the cells prior to transplantation, but incorrectly selected cryoprotectant may adversely affect the safety and the level of energy processes in the cells. The effect of cryoprotectants and freezing–thawing on the structural and morphological status of dogs bone marrow. Final concentrations of cryoprotectants used: DMSO – 10 %, 7 %, 5 %, PEO–400 – 10 %, 15 %, 20 %, glycerol – 10 %, 20 %, 30 %. These results characterize 7 % DMSO as a cryoprotectant most effective for a lot of types of bone

marrow cells of dogs, especially for cells in the early stages of differentiation. DMSO stored for more than 80 % of bone marrow cells of dogs. PEO – 400 is able to maintain cells during cryopreservation, but the final stages of the process, amount of cells is greatly reduced. Glycerol in the concentrations tested, was less effective of the studied cryoprotectants.

Key words: *bone marrow cells, preservation of cells, cryopreservation, cryoprotectants, cell viability, DMSO, glycerol, polyethylenoxide.*

Вступ. Трансплантація клітин кісткового мозку (ККМ), що мають здатність розвиватися у різні клітини крові, використовуються у сучасній ветеринарній медицині як ефективний засіб лікування різноманітних захворювань кровотворної системи [7]. Потреба у ККМ тварин збільшується щороку та вимагає створення ефективних методів зберігання клітин. Низькотемпературне консервування (при –196 °С) ККМ людини, дозволяє зберігати матеріал до трансплантування впродовж декількох років [6]. До того ж у ветеринарній практиці подібні методи лише розробляються. Дослідження способів зберігання ККМ собак під захистом різних кріопротекторів, дозволить розробити ефективну методику їх кріоконсервування і довгострокового зберігання для подальшого застосування в терапії тварин.

Мета і завдання дослідження. Визначення найбільш ефективного кріопротектора для кріоконсервування клітин кісткового мозку собак. Для досягнення поставленої мети вивчали вплив факторів кріоконсервування та дію різних концентрацій проникаючих та непроникаючих кріопротекторів на збереженість клітин кісткового мозку собак.

Матеріали і методи. ККМ собак отримували від статевозрілих самців 3–4 років (n=8) у відповідності з «Загальними принципами експериментів на тваринах», що погоджені I Національним конгресом по біоетиці (Київ, 2001) методом кістковомозкової пункції [5]. Для вибору кріопротекторів приймали до уваги дані по ефективності використання розчинів діметилсульфоксиду (ДМСО), гліцерину, поліетиленоксиду з М.м. 400 (ПЭО–400) за кріоконсервування ККМ людини. Кріоконсервування проводили за наявності криопротекторів в наступних кінцевих концентраціях: ДМСО – 10 %, 7 %, 5 %, ПЕО–400 – 10 %, 15 %, 20 %, гліцерин – 10 %, 20 %, 30 %. Інкубація клітин з ДМСО – 10 хвилин, ПЕО та гліцерином – 30 хвилин за температури 4 °С. Заморожування проводили двоступово: перший етап – занурення в пари рідкого азоту (–80 °С, температура контролювалася термопарою), другий етап занурення в рідкий азот (–196 °С). Розморожування проводили через 24 години, на водяній бані 41°С за постійного похитування впродовж 1–3 хвилин. Кріопротектори вилучали шляхом додавання до ККМ розчину, що складається з 199 середовища, цитрату натрію, сироватки крові ембріональної телячої, з подальшим центрифугуванням. Визначення збереженості ККМ собак проводили за допомогою суправітального фарбування трипановим синім за стандартною методикою [2, 3] в свіжоотриманій суспензії (контроль), відмитих від кріопротектору після інкубації та заморожування–відігріву суспензіях клітин.

Результати дослідження. За показниками, що представлені на рисунку 1 видно, що всі досліджені розчини кріопротекторів на стадії інкубації, оказують негативний невеликий вплив на збереженість ККМ собак, що більш виражено в присутності ДМСО в концентрації 10 %.

Можливо, це пов’язано з токсичними властивостями розчинів ДМСО, що мають концентрацію вище концентрації 8 % (≈ 1 М) [4], або з високою тонічністю середовища, що складається на основі проникаючих кріопротекторів і робить клітини чутливими до заміщення фізіологічного середовища на кріозахисне [8].

Заморожування суспензії ККМ собак без використання кріозахисту негативно відображається на життєздатності клітин і робить суспензію непридатною для трансплантації (рис. 2).

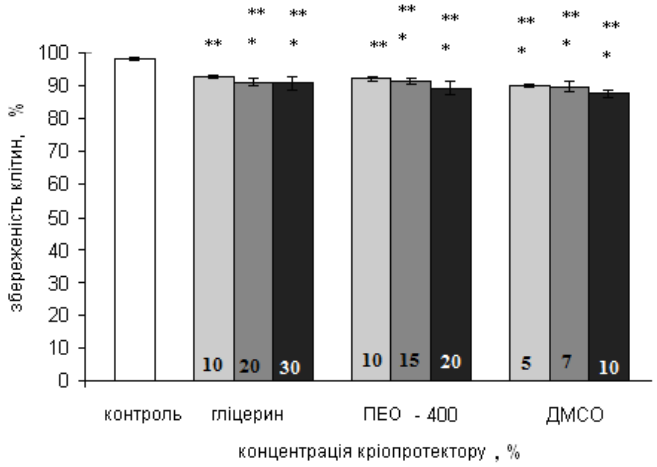

Рис.1. Показники збереженості ККМ собак після інкубації з розчинами кріопротекторів. *** – вірогідно відносно свіжоотриманої суспензії (контроль), p< 0,001. ** – вірогідно відносно контролю, p< 0,01.

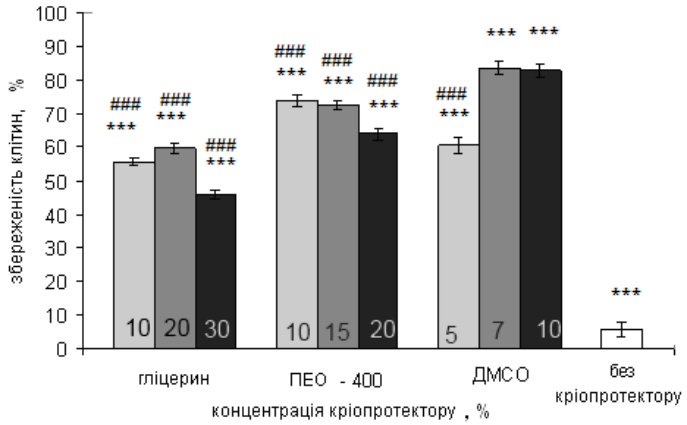

Рис.2. Показники збереженості ККМ собак після заморожування–відігріву під захистом різних концентрацій кріопротекторів. * * * – вірогідно відносно свіжоотриманій суспензії (контроль), p< 0,001. # # # – достовірно відносно клітин інкубованих з кріопротектором, p< 0,001.

Розчини ПЕО–400 забезпечують високий рівень збереженості ККМ, а найбільш виражені кріопротекторні властивостями мають розчини ДМСО 7 та 10 %.

Гліцерин виявився менш ефективним кріопротектором з досліджених. Можливо, це пов'язано зі зниженою проникаючою здатністю гліцерину скрізь плазматичні мембрани більшості типів ККМ при температурі інкубації, в цьому випадку він діє як екзоцелюлярний кріопротектор [1].

Висновки. Після заморожування–відігріву кісткового мозку собак без кріопротектора зберігається лише незначна кількість клітин, що становить менше ніж 6 % від показників контролю. Встановлено, що ДМСО в 7 %, 10 % концентраціях та ПЕО–400 в 10 % і 15 % концентраціях забезпечують збереження близько 80 % клітин кісткового мозку собак після заморожування–відігріву. Гліцерин надає недостатньо високий рівень захисту клітин кісткового мозку собак за проведення кріоконсервування, що становить від 50 % до 60 % від показників контролю.

Перспективи подальших досліджень. Подальша розробка та дослідження методів довгострокового зберігання елементів гемопоезу, дозволить одержати показники, важливі, для створення банку трансплантаційного матеріалу.

Література

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1994.– 430 с.
2. Пушкарь Н. С., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А., Шраго М.И. Консервирование костного мозга при ультранизких температурах с ПЭО–400: Метод. рекомендации. – М., 1984.– 11 с.
3. Цуцаева А. А., Аграненко В. А., Федорова Л. И. Криоконсервирование клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
4. Fuller B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect role in the frozen state / Fuller B. J. // Cryoletters – 2004. – Vol. 25, №6. – P. 375–388.
5. Kushida T. A new method for bone marrow harvesting / Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K., Ngahama T. et al. // Stem cells. – 2000. – Vol. 18, № 6. – P. 453–456.
6. Sppurr E. E. Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5–14 years) criostorage / Sppurr E. E., Wiggins N. E., Marsden K. A., Lowenthal R. M. Ragg S. S. // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, № 3 – P. 210–217.
7. Van de Ouweland F. Enrichement and cryopreservation of bone marrow progenitor cells for autologous reinfusion / Van de Ouweland F., De Witte T., Geerdink P., Haanen C. // Cryobiology. – 1982. – Vol. 19, № 3. – P. 292–298.
8. Willhite D. H. Dimethyl sulfoxide / Willhite D. H., Katz P. I. // J.Appl. Toxicol. – 1984. – Vol. 4, № 3. – P. 155–159.

References

Belous, A. M. Grischenko V. I. (1994). Kriobiologiya. – Kiev: Nauk. dumka, 430. (in Russian).

Pushkar, N. S., Tsutsaeva, A. A., Itkin, Yu. A., Shrago, M. I. (1984). Konservirovanie kostnogo mozga pri ultranizkih temperaturah s PEO–400: Metod. rekomendatsii. – M., 11. (in Russian).

Tsutsaeva, A. A., Agranenko, V. A., Fedorova, L. I. (1983). Kriokonservirovanie kletochnyih suspenziy. – Kiev: Nauk. dumka, 240. (in Russian).

Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect role in the frozen state / Fuller B. J. // Cryoletters. Vol. 25, № 6. – P. 375–388.

Kushida, T. (2000). A new method for bone marrow harvesting / Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K., Ngahama T. et al. // Stem cells. – Vol. 18, № 6. – P. 453–456.

Sppurr, E. E.(2002). Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5–14 years) criostorage / Sppurr E. E., Wiggins N. E., Marsden K. A., Lowenthal R. M., Ragg S. S. // Cryobiology.– Vol. 44, №3 – P. 210–217.

Van de Ouweland, F. (1982). Enrichement and cryopreservation of bone marrow progenitor cells for autologous reinfusion / Van de Ouweland F., De Witte T., Geerdink P., Haanen C. // Cryobiology. Vol. 19, № 3. – P. 292–298.

Willhite, D. H. (1984). Dimethyl sulfoxide / Willhite D. H., Katz P. I. // J.Appl. Toxicol. – Vol. 4, №.3. – P. 155–159.

Стаття надійшла до редакції 13.03.2016

УДК 614.95:636.4

Головаха В. І., д. вет. н., ©
Гарькавий В. О., Москаленко В. П., Ємельяненко О. В., к. вет. н.
Білоцерківський національний аграрний університет, Україна
Суслова Н. І., к. вет. н.
Дніпропетровський державний аграрно–економічний університет

ЯКІСНА ГОДІВЛЯ СВИНЕЙ–ОСНОВА ПРОФІЛАКТИКИ ВНУТРІШНІХ ХВОРОБ

В статті наведені дані різних джерел, що висвітлюють питання виробництва кормів для годівлі, інтенсифікації галузі свинарства у малих і середніх фермерських господарствах за рахунок заміни зернових кормів на повнораціонні сухі комбікорми. По причині, що концентрати в годівлі свиней різко порушують у них фізіологічний процес травлення, значно послаблюють їх імунітет, знижують природню резистентність тварин, наслідком чого є факт, що всі свинокомплекси з терміном експлуатації більше трьох років неблагополучні по різноманітних інфекціях, збудники яких при звичному

© Головаха В. І., Гарькавий В. О., Москаленко В. П., Ємельяненко О. В., Суслова Н. І., 2016