



УДК 615.361.013.85:578.087.9

## ДО ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТКАНИННОГО ПРЕПАРАТУ З ОВЕЧОЇ ПЛАЦЕНТИ

Лобачова І. В., к. с.-г. н.

Інститут тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова «Асканія-Нова»  
НААН - Національний науковий селекційно-генетичний центр з вівчарства

*Визначали можливість оцінки біологічної активності тканинного препарату з овечої плаценти за масою внутрішніх органів кріотравмованих дорослих лабораторних мишей та проліферацією мишиних кумулюсних клітин, культивованих у середовищах різного складу. Встановлено, що попередня обробка самців тканинним препаратом вела до зміни площі шкірного пошкодження ( $p > 0,05$ ) та підшкірного крововиливу ( $p > 0,05$ ), маси нирок ( $p < 0,05$ ) та співвідношення маси печінки до маси тіла ( $p < 0,05$ ). Додавання тканинного препарату посилювало проліферацію кумулюсних клітин при культивуванні як у безсироватковому ( $p < 0,05$ ), так і в доповненій 10 % фетальній сироватці теляти ( $p < 0,05$ ) середовищі SOFaa. Характер змін залежав від типу сировини і способу виготовлення препаратів. Зроблено висновок про можливість оцінки протизапальної здатності препарату – за зміною морфометричних параметрів внутрішніх органів кріотравмованих лабораторних мишей і стимулюючої здатності – за проліферацією кумулюсних клітин, культивованих у доповненій 10 % фетальній сироватці теляти середовищі SOFaa.*

**Ключові слова:** тканинний препарат, плацента, біологічна активність, протизапальна здатність, проліферація.

В останні роки у тваринництві поширюється застосування тканинних препаратів, зокрема, при корекції репродуктивних розладів [1, 2], лікуванні захворювань [3], відгодівлі молодняку [4].

За існуючими нормами [ГСТУ 46.024–2002] препарати попередньо мають бути перевірені за токсичністю, стерильністю та анафілактогенністю. Але ці характеристики не у повній мірі відображають властивості тканинних препаратів як стимуляторів певних функцій організму. Безперечно найбільш адекватним показником біологічних властивостей препаратів є характер реагування тварин. Разом з тим, у загальній реакції організму можна умовно виділити результати впливу окремих чинників – імуномодулюючого, проліферацію та ріст стимулюючого тощо, вплив кожного з яких може маскувати або модулюватися дією іншого. Останнє не дозволяє адекватно оцінити окремі біологічні властивості тканинних препаратів. Крім того, сировину для них отримують від тварин, які різняться за інтенсивністю метаболізму, швидкістю біохімічних реакцій тощо. Тому біологічна активність різних партій препаратів неоднакова. Останнє може бути причиною відмінності в інтенсивності та характеру реакції підданих обробці тварин. У зв'язку з цим постає питання оцінки біологічної активності різних серій препаратів.

На сьогодні розроблено низку методів, які дозволяють оцінити певні характеристики препаратів [5]. Але у виробничих умовах, наприклад при виготовленні ТП на місці, їх застосування не завжди можливе. Метою дослідження було визначення придатності спрощеного прийому оцінки біологічних характеристик тканинних препаратів з овечої плаценти. Об'єкт досліджень – протизапальна і стимулююча властивості тканинного препарату з овечої плаценти, предмет до-



сліджень – проліферація гранульозних клітин лабораторних мишей *in vitro*, шкірні пошкодження і маса внутрішніх органів кріотравмованих лабораторних мишей.

**Матеріал та методи досліджень.** Як матеріал досліджень використано самців і гранульозні клітини яєчників самиць рандомно схрещених (СВАхС57ВL) дорослих (3-6 місяців) лабораторних мишей. При підготовці й утриманні лабораторних тварин та під час проведення дослідів керувалися ГСТУ 46.024–2002.

Дослідження проведено у два етапи. На першому етапі двома дослідями визначали можливість оцінки протизапальної дії ТП за морфологічними параметрами органів при нанесенні мишам-самцям кріотравми. Самці, використані у кожному досліді, належали до одного помету і утримувались разом. Для цього у досліді 1 самцям дослідної групи (ДГ1, n=5) триразово з інтервалом 2 доби ін'єктували у черевну порожнину по 0,1 мл препарату, виготовленого за технологічною схемою 5ТСВ, контрольної групи (КГ1, n=5) – по 0,1 мл стерильного фізіологічного розчину. На п'яту добу після останньої ін'єкції усім тваринам на праве стегно наносили кріотравму притисканням на 20 секунд до оголеної від волосяного покриву шкіри, охолодженої у рідкому азоті металевій пластинки діаметром 1 см і товщиною 2 мм. На третю добу після нанесення пошкодження тварин забивали зміщенням хребців, вимірювали діаметр шкірного ураження, зважували печінку і селезінку. У досліді 2 самцям дослідної групи (ДГ2, n=5) триразово з інтервалом 3 доби у черевну порожнину ін'єктували по 0,1 мл препарату, виготовленого за технологічною схемою 2ТСВ, контрольним (КГ2, n=4) – фізіологічний розчин у тій самій дозі. На третю добу після останньої ін'єкції усім тваринам на праве стегно наносили кріотравму. На четверту добу після травмування тварин забивали декапітацією, вимірювали розмір підшкірного крововиливу, зважували печінку, селезінку і нирки.

На другому етапі визначали можливість оцінки стимулюючої властивості тканинного препарату з овечої плаценти за проліферацією гранульозних клітин при культивуванні останніх *in vitro* у середовищах з різним вмістом препарату. Для отримання гранульозних клітин нестимульованих самиць забивали зміщенням хребців, яєчники переносили у фосфатно-сольовий розчин Дюльбекко (ФСБД), доповнений гепарином (0,01 мг/мл), і подрібнювали. Знайдені ооциткумулюсні комплекси (ОКК) переносили у 0,1 мл ФСБД, що не містило іонів кальцію. ОКК обережно піпетували, оголені ооцити видаляли. Залишені скупчення гранульозних клітин піпетували до отримання поодиноких клітин. Клітини переносили у конічну пластикову пробірку і центрифугували 5 хвилин при 470 g. Надосад прибирали, до осаду додавали 0,2 мл культурального середовища, яке містило у складі 90 % SOFaa і 10 % фетальної сироватки. Осад обережно піпетували, розкапували по 0,05 мл у пластикові чашки Greiner з розкресленою зовні поверхнею. Чашки переносили в ексікатор і культивували за 37С, 5-процентного вмісту вуглекислого газу і 100-процентній вологості. Після 2 годин витримки дебрис видаляли, гранульозні клітини при цьому залишалися прикріпленими до дна чашки. Використане для первинного культивування середовище замінювали експериментальним (0,05–0,1 мл) і переносили на культивування. Обрану ділянку утвореного моношару фотографували при збільшенні у 40–100 разів на початку та через 24, 48 та 72 години культивування. Показник проліферації ( $k$ ) розраховували за формулою:  $k = (N_T - N_0) / (N_0 \cdot T)$ , де  $N_0$  – кількість клітин на окресленій ділянці через 24 години,  $N_T$  – кількість клітин на окресленій ділянці через  $T$  годин культивування. Як остаточний обирали середній між показниками, обрахованими для проміжків між 24 і 48-ю та 48 і 72-ю годинами культивування. Показник  $k$  вимірювали в умовних одиницях (у.о.). Стимулюючу властивість тканинних пре-



паратів оцінювали за зміною показника  $k$  при доповненні середовищ 5, 10 або 20 % препарату за об'ємом. Як базове середовище використовували ТС-199 («Sigma», M2520) або SOFaa (виготовляли самостійно). SOFaa містило: солі за прописом Tervit H.R. et al. [6], суміш мінімальних амінокислот за Іглом (MEM, «Sigma», M7145) 1 % за об'ємом, суміш базових амінокислот за Іглом (BME, «Sigma», B6766) 1 % за об'ємом, піруват натрію («Sigma», P4562) 0,03 мг/мл, глюкозу («Sigma», G7021) 1 мг/мл, лактат натрію («Sigma», L4263) 3,12 мг/мл, глютамін («Рeахім») 0,1 мг/мл, антибіотики.

Тканинний препарат виготовляли зі свіжоотриманої плаценти вівцематок в умовах лабораторії біології відтворення ІТСП «Асканія-Нова» за методиками, які за етапами співпадали зі способом, запропонованим Германом В. А. і Калашніковим І. А. [7, с. 41]. При виготовлянні тканинних препаратів використовували стерильний фізіологічний розчин. Основна відмінність застосованих препаратів була такою: при виготовлянні за технологічною схемою 2ТСВ як сировину використовували плаценту з видаленими котилідонами, за 5ТСВ і 9ТСВ – цілісну плаценту, за 8ТСВ – ізольовані котилідони. При цьому для виготовляння препаратів за 8ТСВ і 9ТСВ використовували частини одної плаценти. Загальна кількість використаних плацент становила 4 шт., при цьому матеріал від різних плацент не змішували. Контрольним посівом на м'ясо-пептоний агар мікробного забруднення, застосованих ТП, не виявлено.

Результати досліджень обраховували статистично з використанням математичного апарату програми «Excel» пакету «Microsoft Office 2010» за загальноприйнятими алгоритмами. Вірогідність відмінності ( $p$ ) між показниками оцінювали за коефіцієнтом Стьюдента ( $t_d$ ).

**Результати досліджень.** При визначенні протизапальної дії у перших двох дослідах тварини не проявили клінічних ознак запалень. У досліді 1 ін'єктування самцям тканинного препарату (група ДГ1) зумовило відсутність візуальних ознак пошкоджень шкіри на п'яту добу після нанесення кріотравми. Маса внутрішніх органів мишей у дослідній групі (ДГ1) була невірогідно меншою за показники контрольних тварин (КГ1) (табл. 1). У досліді 2, оброблені препаратом (ДГ2), тварини за масою печінки, селезінки, нирок, співвідношенням ваги печінки до загальної маси тіла на третю добу після травмування невірогідно перевищували контрольні аналоги (КГ2). У одного самця групи КГ2 під шкірою поряд із місцем нанесення кріотравми виявили порожнину незапального характеру діаметром 6 мм зі гноєм.

Співставлення результатів дослідів 1 і 2 показує, що після ін'єктування препарату, при виготовлянні якого використано цілісну плаценту, діаметр шкірного пошкодження та маса внутрішніх органів були меншими за показники контрольних тварин. При застосуванні препарату, виготовленого плаценти з видаленими котилідонами, показники дослідних тварин були більшими за контрольні, що могло свідчити про посилення реактивності тварин. Отже, характер реагування тварин залежав від сировини, використаної при виготовлянні препарату.

Наступним визначали можливість оцінки стимулюючої здатності ТП за показником проліферації гранульозних клітин. Дослідження проведено трьома дослідями. Культивування за усіма варіантами дослідів проводили з використанням клітин від одних і тих самих тварин.

У першому досліді (варіанти 1–4) клітини піддавали культивуванню у середовищі ТС-199, доповненого 5, 10 або 20 % тканинного препарату. За таких



Таблиця 1

## Морфометричні показники контрольних і дослідних мишей у кінці досліду

Показники	Група тварин		$t_d$
<i>дослід 1 (препарат 5ТСВ)</i>			
	ДГ1 (n=5)	КГ1 (n=5)	
діаметр шкірного пошкодження, мм	0,0	1,8±0,8	2,25
маса печінки, г	1,09±0,11	1,12±0,07	0,23
маса селезінки, г	0,116±0,008	0,132±0,013	1,05
<i>дослід 2 (препарат 2ТСВ)</i>			
	ДГ2 (n=5)	КГ2 (n=4)	
площа підшкірного крововиливу, мм <sup>2</sup>	3,41±0,87	1,67±0,743	1,52
маса печінки, г	1,46±0,141	1,30±0,102	0,91
маса селезінки, г	0,18±0,029	0,12±0,01	1,96
маса нирок, г	0,56±0,023	0,38±0,038	4,05
співвідношення маси печінки до маси тіла	0,068±0,003	0,057±0,0023	2,91

умов прикріплення і незначну проліферацію клітин спостережено лише за 5-процентної концентрації препарату (табл. 2). Зроблено висновок, що препарат за одинокого додавання до середовища ТС-199 у кількості 5, 10 або 20 % за об'ємом не підтримує повноцінний ріст клітин, і, отже, такі варіанти не придатні для визначення стимулюючої здатності препарату.

У другому досліді (варіанти 5–8) визначали вплив тканинних препаратів за використання як базового SOFaa, а також при додатковому внесенні фетальної сироватки теляти (ФСТ). Доповнення середовища лише п'ятьма відсотками препарату сприяло добрій проліферації клітин ( $p < 0,05$ ,  $t_d = 4,33$  проти контрольного варіанту 5). Сумісне додавання препарату і ФСТ збільшувало показник  $k$  як проти варіанту без сироватки ( $p < 0,05$ ,  $t_d = 3,94$ ), так і проти варіанту з додаванням тільки ФСТ ( $p > 0,05$ ,  $t_d = 1,67$ ).

У третьому досліді варіанти (9–13) різнилися типом сировини, використаної при виготовленні препарату (для 8ТСВ – котилідони, 9ТСВ - цілісна плацента), та здійсненні процедури фільтрування середовища через нітроцелюлозний фільтр (0,22  $\mu$ , «Sigma», N8520). Доповнення середовища препаратом, виготовленим за 9ТСВ, у кількості 10 % за об'ємом вірогідно збільшило показник проліферації  $k$  проти контрольного варіанту 9 ( $p < 0,05$ ,  $t_d = 3,80$ ). Усунення процедури фільтрування культурального середовища у варіанті 13 вірогідно зменшило показник  $k$  ( $p < 0,05$ ,  $t_d = 3,88$  проти варіанту 11). За використання препаратів, виготовлених за схемою 8ТСВ, відмічено аналогічні тенденції, які, проте, були статистично невірогідними.

Отже, у першій серії дослідів спостережено тенденцію до різниці між показниками дослідних і контрольних тварин, що свідчить про можливість використання застосованого прийому для оцінки дієвості препарату, зокрема, його протизапальної властивості. Оскільки досліди 1 і 2 були розмежовані за часом, а також різнилися часом нанесення кріотравми і забою тварин, порівнювати їх результати слід з обережністю. Слід, проте, сподіватися, що додаткові дослідження дозволять вдосконалити методику оцінки.



Таблиця 2

## Показник проліферації (к) гранульозних клітин мишей за культивування у середовищах з вмістом різної кількості ТП

№	Тип базового середовища	Вміст ФСТ, % за об'ємом	Тип додано-го ТП	Вміст ТП, % за об'ємом	Фільтрування середовища	n	к, у.о.
<i>дослід 1</i>							
1	TC-199	0	-	0	так	4	0,000 <sup>a</sup>
2		0	5TCB	5	так	4	0,009±0,006 <sup>a</sup>
3		0	5TCB	10	так	4	0,000 <sup>a</sup>
4		0	5TCB	20	так	4	0,000 <sup>a</sup>
<i>дослід 2</i>							
5	SOFaа	0	-	0	так	4	0,000 <sup>b</sup>
6		0	5TCB	5	так	4	0,013±0,003 <sup>a</sup>
7		10	-	0	так	4	0,022±0,007 <sup>a,c</sup>
8		10	5TCB	5	так	4	0,036±0,005 <sup>c</sup>
<i>дослід 3</i>							
9	SOFaа	10	-	0	так	4	0,010±0,004 <sup>a</sup>
10		10	8TCB	10	так	4	0,023±0,007 <sup>a,b</sup>
11		10	9TCB	10	так	4	0,027±0,002 <sup>b</sup>
12		10	8TCB	10	ні	4	0,016±0,006 <sup>a,b</sup>
13		10	9TCB	10	ні	4	0,013±0,003 <sup>a</sup>

Примітка. Показники в одній колонці з різними субскриптами різняться між собою з рівнем вірогідності  $p < 0,05$ . Порівняння показників проведено у межах кожного дослідження (варіанти 1–4, 5–8 і 9–13).

У другій серії дослідів додавання тканинних препаратів за використання як базового SOFaа посилювало проліферативну здатність культурального середовища. Залежність ефекту від типу сировини і процедури фільтрування свідчить про різницю біологічних властивостей препаратів, виготовлених за різними варіантами методики, і, отже, про можливість кількісного визначення стимулюючої здатності тканинного препарату за використаним способом.

У цілому, результати дослідів показали, що біологічні характеристики тканинних препаратів, зокрема, їх стимулююча і протизапальна здатність, можуть бути оцінені за використаними способами. Постає питання доцільності їх розроблення.

Тканинна терапія відноситься до методів, за якими виготовлення препаратів можливе в умовах підприємств і невеликих лабораторій. Останні не завжди мають можливість використовувати затратні методи оцінки. Крім того, сировина для виготовлення тканинних препаратів не надходить регулярно, а потрібні об'єми препаратів невеликі. Разом це є причиною неможливості стандартизації різних партій виготовлених препаратів. Запропоновані прийоми оцінки є більш доступними і за додаткового вдосконалення та «калібрування» їх із загальноприйнятими способами можуть стати альтернативою для використання дрібними лабораторіями.

Слід зазначити перевагу використаного способу визначення кількості клітин моношару. Адже, за звичай підрахунок клітин здійснюють у камері Го-



ряєва або у гематитометрі після відшарування клітин розчином трипсину і версену. Використання мікроскопу і цифрового фотоапарату дозволило не тільки задокументувати результати, а й спростити процедуру підрахунку без втручання у сам процес культивування.

Вибір гранульозних клітин миші був обумовлений тим, що вони більш доступні і добре утворюють моношар у середовищах різного складу, що дозволяє уникнути використання спеціалізованих клітинних ліній, які потребують періодичного пересіву і контролю стерильності. Крім того, спостережено, що ці клітини прикріплюються до дна чашки і добре ростуть навіть за дуже малою посівною концентрацією.

#### **Висновки:**

1. Попередня обробка лабораторних мишей тканинним препаратом з овечої плаценти змінює характер зміни морфометричних параметрів внутрішніх органів тварин після кріотравми, що свідчить про можливість оцінки протизапальної здатності препарату за цими показниками.

2. Доповнення середовища на основі SOFaа тканинним препаратом з овечої плаценти змінює проліферацію культивованих кумулюсних клітин лабораторних мишей, що свідчить про можливість використання такого прийому для оцінки стимулюючої здатності тканинного препарату.

Перспективою подальших досліджень є збільшення чутливості способів шляхом визначення оптимальної кількості і концентрації тканинного препарату.

#### **Бібліографічний список**

1. Гуревичев П. А. Изучение эффективности препаратов плаценты в условиях животноводческого комплекса / П. А. Гуревичев, Д. Н. Уразаев, М. Н. Раеилов // Ветеринарная медицина (Россия). – 2005. – № 3–4. – С. 48–49.

2. Родин И. А. Влияние нового тканевого препарата на биохимические показатели крови коров при некоторых заболеваниях яичников / И. А. Родин, Г. В. Осипчук, С. С. Вачевский // Ветеринария Кубани. – 2011. – № 4. – С. 21–23.

3. Сафиуллов Р. Н. Лечебно-профилактическая эффективность препарата "Экстракт плаценты с лещиной" при катарально-гнойном эндометрите коров: автореф. дис. ... к.в.н.: 16.00.07 / Радик Наильевич Сафиуллов – КГАВМ, Казань, 2009. – 20 с.

4. Острикова Э. Е. Эффективность использования биостимуляторов и пробиотиков при выращивании свиней // Свиноводство. – 2011. – № 5. – С. 23.

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корреспондента РАМН, профессора Р. У. Хабриева. – 2-изд., допол. и перераб. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

6. Tervit H. R. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova / H. R. Tervit, D. G. Whittengham, L. E. A. Rowson // J. Reprod. Fert. – 1972. - Vol. 30. – P. 493–497.

7. Даричева Н. Н., Ермолаев В. А. Тканевая терапия в ветеринарной медицине. Монография. – Ульяновск, УГСХА, 2011. – 168 с. – ISBN 978-5-902532-75-0.



## К ОПРЕДЕЛЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНЕВОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ОВЕЧЬЕЙ ПЛАЦЕНТЫ

Лобачева И. В., Институт животноводства степных районов имени М. Ф. Иванова «Аскания-Нова» НААН – Национальный научный селекционно-генетический центр овцеводства

Определяли возможность оценки биологической активности тканевого препарата из овечьей плаценты за массой внутренних органов криотравмированных взрослых лабораторных мышей и пролиферации мышечных кумулюсных клеток, культивированных в средах различного состава. Установлено, что предварительная обработка самцов тканевым препаратом вела до изменения площади кожного повреждения ( $p > 0,05$ ) и подкожного кровоизлияния ( $p > 0,05$ ), массы почек ( $p < 0,05$ ) и соотношения массы печени к массе тела ( $p < 0,05$ ). Добавление тканевого препарата усиливало пролиферацию кумулюсных клеток при культивировании как в безсывороточной ( $p < 0,05$ ), так и в дополненной 10 % фетальной сыворотки теленка ( $p < 0,05$ ) среде SOFaa. Характер изменений зависел от типа сырья и способа изготовления препарата. Сделан вывод о возможности оценки противовоспалительной способности препарата – по изменению морфометрических параметров внутренних органов криотравмированных лабораторных мышей и стимулирующей способности – по пролиферации кумулюсных клеток, культивированных в дополненной 10 % фетальной сыворотки теленка среде SOFaa.

Ключевые слова: тканевой препарат, плацента, биологическая активность, противовоспалительная способность, пролиферация

## TO EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF TISSUE PREPARATION MADE OF SHEEP PLACENTA

I. Lobachova, M. Ivanov's Institute of Animal Breeding in Steppe Regions «Askania-Nova»

The possibility of estimating the biological activity of sheep placenta tissue preparation following the mass of the internal organs of cryo-injured adult laboratory mice and the proliferation of cultured cumulus cells in media with different composition were determined. It was found that pre-treatment of male with tissue preparations led to changes in the area of skin damages ( $p > 0,05$ ) and subcutaneous hemorrhage ( $p > 0,05$ ), kidney weight ( $p < 0,05$ ) and the ratio of liver weight to body weight ( $p < 0,05$ ). Adding of tissue preparation had enhanced the proliferation of cumulus cells while cultivating both in SOFaa medium alone ( $p < 0,05$ ) and SOFaa medium supplemented with 10 % fetal calf serum ( $p < 0,05$ ). Character of changes had depended from the type of the material and method of manufacture of the tissue preparation. It was concluded that it is possible to evaluate the anti-inflammatory ability of preparation following the changes in morphometric parameters of the internal organs of cryo-injured laboratory mice and the stimulation abilities following the proliferation of cumulus cells cultivated in SOFaa medium supplemented with 10 % of fetal calf serum.

Keywords: tissue preparation, placenta, biological activity, anti-inflammatory ability, proliferation