

17. Часнык Н.Г. Опыт применения электропунктуры в ветеринарии Н.Г. Часнык, В.Я Каськов, И.М. Андрианов Ветеринария. 1993. №7. С.11-14.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНОВ И СИСТЕМ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОРЕЗОНАНСНОЙ МЕТОДИКИ

Бобрицкая О. Н., к.вет.н., доцент

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Аннотация. В работе рассматриваются нетрадиционные методы определения функционального состояния органов и систем организма человека и животных и способы их коррекции

Ключевые слова: энергия, функциональное состояние, биорезонансная медицина, биологически активные точки, электромагнитное излучение.

DETERMINATION OF THE FUNCTIONAL STATE OF ORGANS AND SYSTEMS OF ORGANISM OF ANIMALS WITH THE USE OF BIORESONANT METHODOLOGY

Bobritska O., associate professor

Kharkov state Zooveterinary academy, Kharkiv

Summary. The unconventional methods of determination of the functional state of organs and systems of organism of man and animals and methods of their correction are in-process examined

Key words: energy, functional state, bioresonance medicine, bioactive points, electromagnetic radiation.

УДК: 636.7:612.419:57.086.13

ВЛИЯНИЕ ДМСО И ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КОСТНОГО МОЗГА СОБАК

Водопьянова Л.А., к.б.н., ассистент, vodopyanova@mail.ru

Бобрицкая О.Н., к.вет.н., доцент

Антипин С.Л., к.б.н., доцент

Бусыгина И.Э., к.б.н., ст. преподаватель

Жукова И.А., д.вет.н., доцент

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Аннотация. Исследование костного мозга собак до и после криоконсервирования показало, что сохранность клеток после замораживания-отогрева без криопротектора не превышает 6%. При использовании диметилсульфоксида сохраняется до $83,51 \pm 1,9\%$ клеток, а показатели клеточного состава остаются близкими к показателям контроля.

Ключевые слова: клетки костного мозга, криоконсервирование.

Актуальность проблемы. Костный мозг - это комплекс клеток активно участвующих в кроветворении [1, 2, 3]. Высокий терапевтический потенциал обуславливает необходимость создания резерва клеток костного мозга (ККМ) домашних животных. Таким образом, низкотемпературное консервирование ККМ, является необходимым этапом хранения биоматериала перед трансплантацией и лечением нарушений гемопоэза.

Многие годы ведутся исследования направленные на изучение механизмов и борьбу с негативными последствиями криоповреждения. Применение криопротекторов позволяет повысить сохранность клеток, но вещества, используемые для снижения отрицательных эффектов замораживания-отогрева, сами могут оказывать негативное влияние на клетки [4]. Учитывая гетерогенность популяции КМ, состоящей из клеток различных уровней дифференцировки и выполняющих различные функции [5], высокий интерес представляет выявление клеток наименее чувствительных к действию криопротектора и факторам криоконсервирования.

Цель работы - изучить сохранность клеток и показатели миелограммы костного мозга собак после действия ДМСО и замораживания-отогрева.

Материал и методы исследования. Получение ККМ. ККМ были получены от 3-4 летних собак ($n = 10$). Все животные были свободны от паразитов и вакцинированы. ККМ получали из

бедерной кости методом костномозговой пункции с вымыванием средой 199. Концентрацию клеток в суспензии доводили до 1×10^7 /мл путем разведения средой, содержащей 3% эмбриональной сыворотки крови теленка, 91% - 199 среды, 6% цитрата натрия (рабочая среда) [6].

Обработка ККМ ДМСО и замораживание-отогрев. Диметилсульфоксид (ДМСО) постепенно добавляли в суспензию ККМ до конечной концентрации 5 %, 7 % и 10 % при 4°C. Инкубация при 4°C с ДМСО длилась в течении 10 мин. Замораживание проводили в пластиковых контейнерах «Erpendorf» по двухэтапной программе: охлаждение от 4 °C со скоростью 2-3°C/мин, до -80 °C, с дальнейшим погружением контейнера в жидкий азот (-196 °C на 24 часа) [7, 8, 9, 10]. Отогрев контейнеров осуществляли в воде при 41°C. После отогрева, ДМСО удаляли путем двухступенчатого разбавления суспензии ККМ рабочей средой с последующим центрифугированием (90g, при 4°C, 10 мин).

Определение сохранности клеток и миелограммы. ККМ окрашивали трипановым синим [9]. Поврежденные клетки окрашиваются в синий цвет, жизнеспособные клетки остаются неокрашенными. В мазках, окрашенных по Романовскому, определяли вид ККМ (миелограмму), результаты которого выражали в процентах.

Статистический анализ. Полученные данные представлены как средние значения ($M \pm m$) 10 независимых экспериментов. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера с использованием программы Microsoft Office Excel.

Результаты исследования. Установлено, что костный мозг собак состоит из широкого спектра клеток на разных стадиях развития. При этом преобладают клетки гранулоцитарного ряда на завершающих стадиях дифференцировки (табл.1).

После замораживания ККМ собак без криопротектора сохраняется менее 6% клеток, при этом отсутствуют клетки эритроцитарного ряда, мегакариоциты, моноциты, зрелые гранулоциты, а количество бластов и лимфоцитов снижается на 46,7% и 73,8% соответственно (табл. 1 и 2).

Таблица 1

Показатели миелограммы свежеполученной и замороженной без криопротектора суспензии ККМ собак

Клеточный состав, ($\times 10^6$ /мл)	Интактный КМ (контроль)	КМ после замораживания-отогрева без криопротектора
Общее количество клеток в суспензии КМ собак	10 \pm 0,01	0,56 \pm 0,09**
Бласты	0,38 \pm 0,09	0,20 \pm 0,02*
Миелобласты	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,009*
Промиелоциты	0,39 \pm 0,08	0,07 \pm 0,006**
Миелоциты	0,49 \pm 0,01	0,05 \pm 0,009**
Метамиелоциты	0,43 \pm 0,08	0,01 \pm 0,003**
Палочкоядерные гранулоциты	2,87 \pm 0,13	0
Сегментоядерные гранулоциты	1,11 \pm 0,13	0
Моноциты	0,34 \pm 0,02	0
Лимфоциты	0,63 \pm 0,06	0,17 \pm 0,01**
Мегакариоциты	0,01 \pm 0,003	0
Эритробласты	0,08 \pm 0,003	0
Нормобласты базофильные	0,1 \pm 0,01	0
Нормобласты полихроматофильные	1,32 \pm 0,09	0
Нормоциты оксифильные	0,17 \pm 0,03	0
Полихроматофильные эритроциты	1,35 \pm 0,05	0
Ретикулярные клетки	0,29 \pm 0,05	0,01 \pm 0,001**

** - значения достоверны относительно интактных ККМ собак (контроль), $P < 0,001$.

* - значения достоверны относительно контроля, $P < 0,05$.

Без криозащиты замораживание негативно влияет на жизнеспособность большинства видов ККМ собак, что делает такой биоматериал непригодным для трансплантации. Невозможно сохранить оптимальное количество клеток разных видов, поэтому целесообразно разрабатывать способы криоконсервирования ККМ, способных к пролиферативной активности и дифференцировке.

Принимая во внимание исследования [1, 10, 11] низкотемпературного хранения КМ человека и лабораторных животных, для криозащиты КМ собак был выбран ДМСО. Однако уже на стадии инкубации до замораживания, данный криопротектор оказывает негативное влияние на сохранность клеток (табл. 2).

Таблица 2.

Сохранность ККМ собак

ККМ	Сохранность ККМ, %	
	Инкубация	Замораживание-отогрев
Интактные ККМ	98,26±0,3	-
Без криопротектора		5,7±2
ДМСО 10%	97,16±1,84	
ДМСО 7%	87,63±1,69*	82,92±2*
ДМСО 5%	89,72±1,68*	83,51±1,9*
	89,91±1,23*	60,43±2,34 [#]

* - значения достоверны относительно интактных ККМ собак (контроль), $P < 0,001$.

[#] - значения достоверны относительно клеток после инкубации с криопротектором, $P < 0,001$.

Возможно, это связано с присутствием в суспензии клеток поврежденных на стадии получения КМ и индивидуально чувствительных к действию ДМСО.

После криоконсервирования с ДМСО уровень сохранности клеток составлял от 60±2,3% до 83,51±1,9% (табл. 2). Наиболее выраженными криопротекторными свойствами обладает ДМСО в концентрации 7% и 10%.

При этом минимальные изменения в клеточном спектре выявлены после замораживания-отогрева КМ с ДМСО 7% (табл. 3).

Криолабильными клетками являются зрелые гранулоциты, эритроцитарные клетки и мегакариоциты. При использовании ДМСО во всех выбранных концентрациях не изменялось количество бластов и незрелых гранулоцитов.

Изменение компонентного состава КМ собак после криоконсервирования происходит, в основном за счет снижения количества клеток находящихся на завершающих этапах созревания. Это, по-видимому, не должно отражаться на терапевтических свойствах КМ, так как основной эффект зависит от стволовых клеток и клеток, находящихся на ранних стадиях дифференцировки, способных обеспечить восстановление кроветворной функции [3, 11, 12].

Таблица 3

Показатели миелограммы после замораживания-отогрева КМ собак с ДМСО

Клеточный состав, ($\times 10^6$ /мл)	КМ после замораживания-отогрева с криопротектором		
	ДМСО 5%	ДМСО 7%	ДМСО 10%
Общее количество клеток в суспензии КМ собак	6,04±0,23	8,35±0,19	8,29±0,19
Бласты	0,37±0,02	0,38±0,06	0,38±0,05
Миелобласты	0,07±0,01	0,07±0,02	0,07±0,02
Промиелоциты	0,39±0,02	0,39±0,05	0,39±0,03
Миелоциты	0,48±0,01	0,49±0,01	0,49±0,02
Метамиелоциты	0,42±0,02	0,42±0,02	0,42±0,02
Палочкоядерные гранулоциты	1,8±0,12	2,84±0,17	2,84±0,17
Сегментоядерные гранулоциты	0	0,19±0,01	0,19±0,02
Моноциты	0,3±0,01	0,32±0,02	0,32±0,03
Лимфоциты	0,63±0,06	0,63±0,02	0,63±0,02
Мегакариоциты	0	0	0
Эритробласты	0,08±0,02	0,08±0,02	0,08±0,02
Нормобласты базофильные	0,09±0,02	0,09±0,02	0,09±0,01
Нормобласты полихроматофильные	1,17±0,12	1,29±0,08	1,28±0,17
Нормоциты оксифильные	0	0,01±0,002	0,004±0,001

Полихроматофильные эритроциты	0	0,88±0,09	0,83±0,02
Ретикулярные клетки	0,25±0,01	0,27±0,03	0,22±0,02

* - значения достоверны относительно интактных ККМ собак (контроль), $P < 0,001$.

Выводы

Установлено, что наиболее эффективным для ККМ собак является 7% ДМСО, обеспечивающий высокий уровень защиты гетерогенной популяции КМ собак в процессе криоконсервирования. Это позволяет высказать предположение, что суспензия КМ собак криоконсервированная в присутствии 7% ДМСО проявит максимальный терапевтический эффект при использовании ее в лечении различных нарушений гемопоэза у собак.

Литература

1. Baust J. G., Advances in biopreservation / Baust J. G, Baust J. M. // Ed. by - By Taylor & Francis Group. LLC. 2007. - P. 15 - 62.
2. Anastasia L. Cell reprogramming: expectations and challenges for chemistry in stem cell biology and regenerative medicine / Anastasia L., Pelissero G., Venerando B., Tettamanti G. // Cell Death and Differentiation. – 2010. - №17. – P. 1230–1237.
3. Borjesson D. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease / Borjesson D., Peroni J. // Clin Lab Med. – 2011. - Vol. 31, № 1. – P. 109-123.
4. Willhite D.H. Dimethyl sulfoxide / Willhite D.H., Katz P.I. // J.Appl. Toxicol. – 1984. – Vol. 4, №3. – P. 155-160.
5. Abkowitz J.L. Behavior of hematopoietic stem cells a large animals / Abkowitz J.L., Persik M.T., Shelton G.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92, №6. – P. 2031-2035.
6. Гольцев А.М. Оценка гемопоэтического потенциала стволовых кроветворных клеток костного мозга с измененным исходным статусом под действием факторов криоконсервирования / А. М. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Ю. А. Козлова, Т. М. Гурина, М. В. Останков // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 320-323.
7. Белоус А.М. Криоконсерванты / Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. – К.: Наукова думка, 1979. – 197 с.
8. Kawano Y. Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer / Y. Kawano, C. L. Lee, T. Watanabe, T. Abe // Ann. Hematol.- 2004. – Vol. 83, №1. – P. 50-54.
9. Консервирование костного мозга при ультранизких температурах с ПЭО – 400: методические рекомендации / [Пушкарь Н.С., Цуцаева А.А., Иткин Ю.А., Шраго М.И.] – М.: 1984. - 11 с.
10. Idei K. Investigation of Various Methods for the Cryopreservation of Canine Bone Marrow- Derived CD34+ Cells / K. Idei, S. Matsuura, Y. Fujino // J. Vet. Med. Sci. – 2008. – Vol. 70, №11. – P. 1211–1217.
11. Vrhovac R. Post-thaw viability of cryopreserved hematopoietic progenitor cell grafts: does it matter? / Vrhovac R., Perić Z., Jurenec S., Kardum-Skelin I. // Coll Antropol. – 2010. - Vol. 34, № 1. – P. 163-169.
12. McCullough J. Long-term storage of peripheral blood stem cells frozen and stored with a conventional liquid nitrogen technique compared with cells frozen and stored in a mechanical freezer / McCullough J., Haley R., Clay M., Hubel A. // Transfusion. – 2010. - Vol. 50, №4. – P. 808-19.

ВПЛИВ ДМСО ТА ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДІГРІВУ НА КЛІТИННИЙ СКЛАД КІСТКОВОГО МОЗКУ СОБАК

Л.А. Водоп'янова - к.б.н., асистент, vodopyanova@mail.ru, О.Н. Бобрицька – к.вет.н., доцент
С.Л. Антіпін – к.б.н., доцент, І.Е. Бусигіна – к.б.н., ст. викладач, І.О. Жукова – д.вет.н., доцент

Анотація. Дослідження кісткового мозку собак до та після криоконсервування показали, що збереженість клітин після заморожування-відігріву без кріопротектора не перевищує 6%. При використанні ДМСО зберігається до 83,51 ± 1,9% клітин, а показники клітинного складу залишаються близькими до показників контролю.

Ключові слова: клітини кісткового мозку, криоконсервування.

THE DMSO AND FREEZE-THAW INFLUENCE ON DOGS' BONE MARROW COMPOUND

Vodopyanova L.A. candidate of Biological science, Bobritskaya O.N. candidate of Veterinary science
Antipin S.L. candidate of Biological science, Busygina I.E. candidate of Biological science, Zhukova I.A.
doctor of Veterinary science
Kharkov state zooveterinary academy

Summary. The research of dogs' bone marrow before and after cryopreservation have been studied. It has been found, that cells viability after freeze-thaw without cryoprotectant did not exceed 6%. At the use of DMSO saved to $83,51 \pm 1,9\%$ of cells, and the indexes of bone marrow compound remain near to the indexes of control.

Key words: bone marrow cells, cryopreservation.

УДК 636.321.38:612.664:615.25

ДИНАМИКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПРОДУКТИВНЫХ ПОКАТЕЛЕЙ ОВЦЕМАТОК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА «БИОСВИТ»

Жукова И.А., д. биол. н., доцент

Бусыгина И.Э., к. биол. н., ст. преподаватель

Водошнянова Л.А., к.биол. н., ассистент

Журавлева Т.Г., преподаватель

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Абу Муис Фади Кадим, ветеринарный врач

Аннотация. В опытах на лактирующих овцематках установлено, что пробиотик «Биосвит» стимулирует процессы гемопоэза, белкового обмена, повышает молочную продуктивность и способствует своевременному осеменению овец.

Ключевые слова: «Биосвит», овцематки, лактация, обмен веществ, оплодотворение, молочная продуктивность

Актуальность проблемы. Использование биологически активных веществ естественного происхождения для повышения адаптогенности и биостимуляции продуктивных качеств животных становится все более актуальным. Отсутствие токсичности, побочных отрицательных эффектов при воздействии на организм, повышение количества и качества производимой животноводческой продукции при низкой себестоимости и простоте изготовления биодобавок, указывает на необходимость применения их в животноводстве [1,2].

На кафедре физиологии с.-х. животных ХГЗВА получены препараты «Гумосвит», «Биосвит», «Даросвит».

Наши исследования по применению этих препаратов в молочном и мясном скотоводстве, свиноводстве и птицеводстве показали, что у животных и птиц увеличивалась оплодотворяемость на 8-12%, повышалась жизнеспособность молодняка при снижении гибели новорожденных на 12-16% и возрастал прирост массы тела на 12-21%.

У свиноматок увеличивалась рождаемость плодов до 15-16 голов, повышалась молочная продуктивность, что способствовало увеличению массы тела поросят на 7-13%.

У птиц повышалась яйценоскость на 11-18%, увеличивалась количество активной спермы и ее густота у петухов от 14 до 26% [3,4].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния препарата «Биосвит» на молочную продуктивность и половую активность овец. Препарат был изготовлен из сырья, собранного в экологически чистых регионах и представлял собой экстракт, который получали из разнообразных представителей наземной и морской флоры с добавлением микроэлементов и водорастворимых витаминов.

Материал и методы исследований. Опыты проводились на 15 лактирующих овцах в возрасте 3-3,5 лет, в период 2-го месяца лактации. Из них были сформированы 2 группы: контрольная (5 голов) и экспериментальная (10 голов). Овцы содержались в загонках, снабженных кормушками и поилками, с навесом от дождя и солнца.

Животные пользовались пастбищем с 6.00 до 18.00 часов при свободном допуске к проточной воде.

Период исследований совпал с засухой, поэтому травостой был низкий и высохший, подопытные животные имели низкую упитанность, несмотря на подкормку на пастбище кукурузой, пшеничной и ячменной дертью. Высокие дневные температуры воздуха приводили к низкой двигательной активности и снижению аппетита. Овцы не приходили в охоту даже после традиционной стимуляции эстрогенами.