

ют, о том, что под влиянием ИЛОКа на 5-е сутки снижается активность АлАТ (37,1 %), АсАТ (10,9 %) и ЛФ (17,3 %) у лошадей опытной группы. При этом в данный период активность ЛФ в опытной группе была ниже чем в контрольной ($p < 0,05$). Подтверждением эффективности ИЛОКа является динамика АсАТ у больных коров. Нами установлено, что в опытной группе активность фермента ($p < 0,01$) меньше относительно первых суток. Кроме этого, конечные показатели активности в опытной группе были ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной.

Ключевые слова: лазерное облучение крови, воспалительные процессы, кони, коровы.

Kulynytsch S.M., Panasova T.G., Skryl V.U., Jurtschenko I.I. The effectiveness of intravascular laser irradiation of blood on the basis of changes of serum biochemical parameters in the treatment of inflammatory processes in horses and cows

Biochemical studies of blood serum from infected animals suggest that under the influence of ILIB on the 5th day reduced ALT activity (37,1 %), AST (10,9 %) and LF (17,3 %) experienced horses group. In the active period of LF activity in the experimental group was lower than in the control ($p < 0,05$). Confirmation of the effectiveness of ILIB is the dynamics of AST in sick cows. We have found that in the control group the activity of the enzyme ($p < 0,01$) smaller relative to the first day. Furthermore, the final performance activity in the experimental group was lower ($p < 0,05$) than in the control.

Keywords: laser irradiation of blood, inflammation, horses, cows

Дата надходження до редакції: 22.06.2014 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Камбур М.Д.

УДК 57.086.13:612.111: [636.1 + 636.8]

**ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ – ОТОГРЕВА
НА СОХРАННОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЖИВОТНЫХ – КОМПАЬОНОВ**

О. А. Первушина, аспирант

Г. Ф. Жегунов, д.биол.н., професор

О. Н. Денисова, к.биол.н., ст.преподаватель

Харьковская государственная зооветеринарная академия

В работе исследована степень сохранности эритроцитов лошади и кошки после инкубирования и замораживания - отогрева под защитой 10 % ДМСО; 17,5 % ГЭК; 20 % глицерина. Были определены эффективные комбинации криопротекторов ДМСО/ГЭК, глицерин/ГЭК, которые значительно повышают сохранность криоконсервированных эритроцитов, по сравнению с результатами замораживания под защитой монокомпонентных сред.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, диметилсульфоксид, гидроксипроцерамил, криоконсервирование, криопротекторы.

Криоконсервирование эритроцитов в ветеринарной практике основывается на известных методах замораживания клеток крови гуманной медицины. Установлено, что глицерин является наиболее эффективным криопротектором при криоконсервировании эритроцитов человека [8], однако не способен обеспечить защиту эритроцитов лошади, быка и собаки при замораживании – отогреве [1]. Наиболее успешным криопротектором для этих клеток оказался диметилсульфоксид (ДМСО) в 10 % концентрации [2]. Существенным недостатком ДМСО является его цитотоксическое действие.

В последнее время широкое применение для защиты клеток от криоповреждений находят комбинированные криопротекторы. В работе [5] показана эффективность таких криопротекторов (ГЭК и ДМСО) для криоконсервирования клеток периферической крови человека.

В работе [7] сравнивали гидроксипроцерамил (ГЭК) и глицерин как возможную замену проникающего криопротектора для криоконсервации эритроцитов собак. Показано, что ГЭК в

12,5 % концентрации оказался лучшим криопротектором по сравнению с другими концентрациями ГЭК.

Эритроциты разных млекопитающих имеют свои особенности [3,6]. В частности, эритроциты лошади относят к группе высококалиевых, так как они содержат 88 ммоль/л K^+ внутри клетки. В эритроцитах кошки содержится натрий как преобладающий катион в количестве 104 ммоль/л и поэтому относится к низкокалиевой группе.

Цель работы – исследование сохранности эритроцитов лошади и кошки после замораживания – отогрева с применением комбинированных криопротекторов.

Материалы и методы. Материалом исследования служили эритроциты лошади и кошки. Животные были здоровыми, половозрелыми самцами. Манипуляции с животными проводили согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.)

Кровь заготавливали на глюкозо-цитратном консерванте и хранили не более 6 часов при 4°C

до проведения экспериментов. Эритроциты осаждали центрифугированием при 750 г 5 мин. После удаления плазмы эритроциты трижды промывали 5-кратным объемом изотонического солевого раствора (150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4).

Для криоконсервирования эритроцитов использовали следующие криоконсервирующие среды:

1. 20 % ДМСО, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4;
2. 15 % ДМСО, 25 % ГЭК, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4;
3. 35 % ГЭК, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4;
4. 30 % Глицерин, 40 % ГЭК, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4;
5. 40 % Глицерин, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4;

Раствор криопротекторов смешивали с эритроцитом в соотношении 1:1 и выдерживали 15 мин. при 22° С. Замораживание осуществляли в микротюбиках «EPENDORFF». Размораживание проводили на водяной бане (40° - 42° С).

Уровень гемолиза определяли спектрофотометрически при 543 нм [9]:

$$\% \text{ гемолиза} = [A_1/A_2] \times 100 \%,$$

где, A_1 - оптическая плотность исследованной пробы

A_2 - оптическая плотность при полном гемолизеконтрольной пробы

По уровню гемолиза судили о степени сохранности эритроцитов.

Криопротектор удаляли путем серийного центрифугирования. На первом этапе к суспензии эритроцитов добавляли равный объем 0,6 М NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4. После этого эритроциты дважды промывали 0,15 М NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4.

Экспериментальные результаты представ-

лены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего. Различия между группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. На данном этапе ГЭК является наиболее перспективным криопротектором для криоконсервации эритроцитов, так как является нетоксичным плазмозаменителем и в отличие от ДМСО и глицерина не требует трудоемкого удаления из среды криоконсервирования. Поэтому нами были использованы комбинации криопротекторов ДМСО/ГЭК, Глицерин/ГЭК, что позволяет снизить концентрацию проникающих криопротекторов, а соответственно и их цитотоксическое действие.

В табл. 1 представлен уровень гемолиза эритроцитов лошади после низкотемпературного консервирования. После инкубирования с однокомпонентными средами 10 % ДМСО; 17,5 % ГЭК и 20 % глицерином уровень гемолиза составил 0,15 %; 0,26 %; 8,42 % соответственно, после замораживания-отогрева уровень гемолиза вырос до 15,56 %; 13,44 % и 46,76 % соответственно, однако после удаления проникающих криопротекторов 10 % ДМСО и 20 % глицерина этот показатель увеличился до 45,88 % и 98,1 % соответственно. ГЭК является непроникающим криопротектором и не требует удаления перед трансфузией. В случаях использования комбинированных криопротекторов 7,5 % ДМСО + 12,5 % ГЭК и 15 % глицерин + 20 % ГЭК уровень гемолиза после инкубирования составил 0,26 % и 6,27 % соответственно. После замораживания - отогрева и удаления криопротектора уровень гемолиза значительно снизился по сравнению с однокомпонентными средами и составил для 7,5 % ДМСО + 12,5 ГЭК - 18,5 %, что позволило сохранить 81,5 % клеток. Для 15 % глицерин + 20 % ГЭК уровень гемолиза составил 29,84 %, сохранность при этом 70,16 %.

Таблица 1.

Уровень гемолиза эритроцитов лошади после влияния криопротектора, замораживания – отогрева, удаления криопротектора, %

Комбинация криопротекторов (конечные концентрации)	Инкубирование с криопротектором	Замораживание-отогрев	Замораживание – отогрев и удаление криопротектора
1. 10 % ДМСО	0,15 \pm 0,04	15,56 \pm 0,47	45,88 \pm 0,48
2. 7,5% ДМСО + 12,5% ГЭК	0,26 \pm 0,03	4,44 \pm 0,26	18,5 \pm 0,36
3. 17,5% ГЭК	0,24 \pm 0,048	13,44 \pm 0,37	-
4. 15% ГЛ+20 % ГЭК	6,27 \pm 0,1	9,92 \pm 0,19	29,84 \pm 0,5
5. 20 % ГЛ	8,42 \pm 0,24	46,76 \pm 0,46	98,1 \pm 0,42

В табл. 2 представлен уровень гемолиза эритроцитов кошки после низкотемпературного консервирования. После инкубирования с 10 % ДМСО и 20 % глицерином уровень гемолиза составил 0,2% и 4,26 % соответственно. Однако процесс замораживания оказал существенное влияние на клетки и уровень гемолиза повысился до 98,6 % для 10 % ДМСО и 41,8 % для 20 % глицерина. Удаление 10 % ДМСО и 20% глицерина оказало негативное влияние, так как повре-

ждение клеток составило 100 % и 97,92 % соответственно. В случаях с комбинированными криопротекторами 7,5 % ДМСО + 12,5 % ГЭК и 15 % глицерин + 20% ГЭК уровень гемолиза после инкубирования составил 1,08 % и 3,24 % соответственно, на этапе замораживание – отогрев 68,72 % и 28,48. После удаления криопротектора уровень гемолиза существенно вырос до 100 % и 85,54 % соответственно. Из всех вышеперечисленных криопротекторов лучшим оказался

17,5 % ГЭК. Уровень гемолиза на этапе замора- | живание – отогрев составил 26,34 %.

Таблица 2.

Уровень гемолиза эритроцитов кошки после влияния криопротектора, замораживания – отогрева, удаления криопротектора, %

Комбинация криопротекторов (конечные концентрации)	Инкубирование с криопротектором	Замораживание-отогрев	Замораживание – отогрев и удаление криопротектора
1. 10 % ДМСО	0,2±0,03	98,6±0,92	100 %
2. 7,5 % ДМСО 12,5 % ГЭК	1,08±0,11	68,72±0,82	100 %
3. 17,5 % ГЭК	0,4±0,86	26,34±0,83	-
4. 15 % ГЛ+20 % ГЭК	3,24±0,25	28,48±1,07	85,54±3,1
5. 20 % ГЛ	4,26±0,22	41,8±1,42	97,92±2,3

Основываясь на данных представленных в таблицах 1 и 2 можно заключить, что для эритроцитов лошади более успешным оказалось применение комбинированного криопротектора 7,5 % ДМСО + 12,5 % ГЭК. Сохранность клеток при этом составила 81,5 %. Для эритроцитов кошки наиболее эффективным криопротектором оказался 17,5 % ГЭК. Эритроциты лошади оказались более устойчивыми к факторам низкотемпературного воздействия. Возможно, это связано с внутриклеточным содержанием ионов Na^+ и K^+ в эритроцитах этих животных, что требует дополнительных исследований.

Так же следует отметить, что удаление криопротектора после размораживания эритроцитов существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток

и приводит к потере части клеток в процессе отмывания.

Выводы. 1. Степень сохранности эритроцитов лошади и кошки при одних и тех же условиях замораживания - отогрева различна. Большую устойчивость к замораживанию – отогреву проявили эритроциты лошади.

2. Используемые комбинации криопротекторов для эритроцитов лошади позволили сохранить после замораживания – отогрева 95 % клеток.

3. Удаление криопротектора значительно снижает сохранность клеток.

4. Для эритроцитов кошки лучшим криопротектором оказался 17,5 % ГЭК, что позволило сохранить 73,6 % клеток после замораживания – отогрева.

Список использованной литературы:

1. Денисова О.Н. Криочувствительность эритроцитов различных видов млекопитающих: дис... канд. биол. наук: 03.00.19 // Харьковская гос. зооветеринарная академия / Денисова О.Н.. — Х., 2006. — 169л. : рис., табл. — Библиогр.: л. 127-151.
2. Денисова О.Н. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля, глицерина / Денисова О.Н., Жегунов Г.Ф., Бабийчук Л.А. — Харьков: Проблемы криобиологии. — 2005. — №2. — С. 195-201.
3. Черницкий Е.А. Структура и функция эритроцитарных мембран / Черницкий Е.А., Воробей А.Б.. — Минск: Наука и техника, 1981. — 213 с.
4. Bunn H.F. Evolution of mammalian hemoglobin function Blood / Bunn H.F.. — 1981. — Vol. 58, № 2. — 189-197 p.
5. Clapissou G., Salinas C., Malacher P. et al. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) and dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone // Bull. Cancer. — 2004. — Vol. 91, №4. — P. E97-102.
6. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M. Clinical biochemistry of domestic animals. — New York: Academic Press, 1989. — 932 p.
7. Kim H., Tanaka S., Une S. et al Y. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation // J Vet Med Sci. 2004 Dec; 66(12):1543-1547.
8. Mazur P., Miller R.H. Permeability of the human erythrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 and 20°C // Cryobiology. — 1976. — Vol.13. — P. 507-522.

Первушина О.А., Жегунов Г.Ф., Денисова О.Н. Влияние замораживания-відігрівання на збереження еритроцитів тварин-компаньонів

У роботі досліджена ступінь збереження еритроцитів коня і кішки після інкубування і заморожування - відігрівання під захистом 10 % ДМСО; 17,5 % ГЕК; 20 % гліцерину. Були визначені ефективні комбінації криопротекторів ДМСО/ГЕК, гліцерин/ГЕК, які значно підвищують збереженість криоконсервованих еритроцитів, в порівнянні з результатами заморожування під захистом монокомпонентних середовищ.

Ключові слова: еритроцити, гемолиз, диметилсульфоксид, гідроксиетилкрахмаль, криоконсервування, криопротектори.

Pervushina O.A., Zhegunov G. F., Denisova O.N. Effect of freezing-warming thawing on the preservation of erythrocytes companion animals

The degree of erythrocyte preservation in horses and cats after incubation and freezing – warming under the protection of 10 % DMSO; 17,5 % HES; 20% glycerin has been studied. The effective combinations of cryoprotectors DMSO/HES, glycerin/HES that significantly increase the keeping quality of

cryopreserved erythrocytes as compared to the results of freezing under the protection of monocomponent medium have been determined.

Keywords: erythrocytes, haemolysis, dimethylsulphoxide, hydroxiethylstarch, cryopreservation, cryoprotectors.

Дата надходження до редакції: 17.07.2014 р.

Рецензент: д.вет.н., доцент Замазій А.А.

УДК: 636:612.3:636:576.8

ВИКОРИСТАННЯ ПОПЕРЕДНИКІВ ДЛЯ СИНТЕЗУ СКЛАДОВИХ КОМПОНЕНТІВ МОЛОКА ТКАНИНАМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ КОРІВ У ПЕРШОМУ ПЕРІОДІ ЛАКТАЦІЇ

М. Д. Камбур, д.вет.н., професор

А. А. Замазій, д.вет.н., професор

А. В. Піхтірьова, к.вет.н.

В. Ю. Кассіч, д.вет.н., професор

Сумський національний аграрний університет

У статті наведені дані, щодо використання тканинами молочної залози корів попередників для синтезу складових компонентів молока у першій період лактації за впливу бовінсоматотропіну. Встановлено, що найбільш ефективно загальний білок, глюкозу, β -оксимасляну кислоту, леткі жирні кислоти та оцетову кислоту з притікаючої крові використовували тканини молочної залози корів, яким щомісячно внутрішньом'язово вводили по 100 МЕ бовінсоматотропіну.

Ключові слова: корови, молоко, тканини молочної залози, лактація, бовінсоматотропін, кров, артеріо-венозна різниця, загальний білок, глюкоза, β -оксимасляна кислота, леткі жирні кислоти, оцетова кислота.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Забезпечення потреб населення в молоці та молочних продуктах ставить перед ветеринарною наукою цілу низку науково-практичних завдань, які, окрім удосконалення організаційних і технологічних заходів, вимагають проведення ґрунтовних фундаментальних досліджень з метою вивчення фізіолого-біохімічних особливостей лактопоезу корів. Насамперед це стосується виявлення критичних етапів у функціональній активності молочної залози корів і встановлення лімітуючих факторів біосинтезу складових компонентів молока. Дослідженнями багатьох авторів встановлено ряд закономірностей біосинтезу молока, а також виявлено окремі аспекти регуляції секреторної діяльності молочної залози. Вивчення цих процесів у корів набуває важливого значення, оскільки знання особливостей секреторної функції молочної залози впродовж всієї лактації є основою для прогнозування рівня подальшої молочної продуктивності.

Зв'язок з важливим науковим і практичним завданням. Дослідження проводились за тематикою: «Розробка мультипараметричної системи виробництва молока на основі секреторно-творючої функції молочної залози пре- та постнатального розвитку тваринного організму і методи їх корекції», 0108U010281.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Центральною ланкою регуляції лактації, як відомо, є гіпоталамо-гіпофізарна система. Такі найважливіші лактогенні гормони, як пролактин і гормон росту - соматотропін (СТГ), продукуються передньою долею гіпофіза (аденогіпофіз). Вперше це було виявлено в 30-ті роки Г.І. Азімовим і

Н.К. Крузі. У 1944 році СТГ вдалося отримати в чистому вигляді з бичачих гіпофізів і почати його детальне дослідження [1].

Лактогенна активність СТГ була переконливо продемонстрована на коровах, козах і вівцях. Ін'єкції СТГ залежно від дози гормону, тривалості введення і ряду інших чинників збільшували надой на 7,60-71,60 %. Вміст основних компонентів молока в одних експериментах не змінювався, в інших – збільшувалася. Після припинення введення СТГ секреція молока поверталася до контрольного рівня [2, 4].

Соматотропін - поліфункціональний гормон, особливість якого – відсутність специфічного органу-мішені, характерного для більшості інших гормонів. Основні ефекти СТГ - стимуляція соматичного і кісткового росту і збільшення розмірів органів і тканин, а також участь у регуляції білкового, вуглеводного і жирового обмінів. Крім того, СТГ стимулює функції різних ендокринних залоз, включаючи наднирники, щитоподібну, паращитоподібну, підшлункову і статеві залози, регулює розвиток і функцію імунної системи, стимулює еритропоез, впливає на екскреторну функцію нирок і поведінкові реакції [3, 5, 6].

Мета та завдання - дослідити використання тканинами молочної залози корів попередників для синтезу складових компонентів молока з притікаючої крові за умов введення різних доз аналога СТГ (БСТ) щомісячно у перший період лактації

Матеріали і методи дослідження. Дослідження впливу бовінсоматотропіну (БСТ) на процес лактації у корів проводили на тваринах чорно-рябої породи впродовж 1-го періоду лактації в умовах господарства «САД», віварію факультету