

8. Нежданов А.Г., Дашукаева К.Г. Доклиническая диагностика акушерской патологии у коров // Материалы Всерос.науч. и учеб.- методич.конф. по акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных. Воронеж, 1994. - С. 104.

9. Нежданов А.Г. Экологические аспекты лекарственной терапии коров при эндометритах // Материалы Всерос.науч. и учеб.- методич.конф. по акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных. Воронеж, 1994. -С.107-108.

10. Никитин В.Я., Тимченко Л.Д. Сравнительная характеристика методов лечения коров, больных острыми послеродовыми эндометритами // Морфофункциональные показатели продуктивн.животных. - Ставрополь,1992. - С. 4-7.

11. Петров В.А., Парахин А. Роль микробного фактора в этиопатогенезе и частота одновременно протекающих субклинического мастита и эндометрита у коров. - Актуальные проблемы болезней молодячка в современных условиях. - Воронеж, 2002. -С.483-485.

12. Федосова Н.Х., Кононов Г.А. Использование ПФФ - 2альфа для лечения послеродовых эндометритов у коров // Материалы Всерос.науч. и учеб.- методич.конф. по акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных. Воронеж, 1994. - С.140-141.

13. Хабибуллин Р.Х. Эффективный способ профилактики и лечения гинекологических болезней у коров //Воспроизводство с.-х. животных на промышленной технологии содержания. - Новосибирск: НТБ,1982. -Вып.29.- С.19-23.

УДК. 577.158

СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ КАК РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ АНЕМИЙ У МОЛОДНЯКА С/Х ЖИВОТНЫХ.

Мальевская.Е.В.,¹ Кубышин.В.Л.,² Горбач.З.В.¹

**УО «Гродненский государственный аграрный университет»¹,
Институт биохимии НАНБ².**

Определение ключевых ферментов пентозофосфатного пути в эритроцитах у молодняка с/х животных дает возможность проводить раннюю диагностику энзимопенических гемолитических анемий.

Проведенные исследования свидетельствуют, что активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6ФГДГ) значительно меняются в зависимости от возраста, различных форм врожденного малокровия, а также воздействия инфекций и применения лекарственных препаратов (1,2,4,5,6,7). Изменения активности ферментов эритроцитов (Г6ФДГ, 6ФГДГ) наблюдается в более ранние сроки гемолитического заболевания, чем происходит накопление значительных количеств билирубина в сыворотке крови и отражает первую фазу ответа организма на фермолизгиперпластическую реакцию костного мозга с выбросом в периферическую кровь незрелых клеток крови.

Описанный в литературе (8) спектрофотометрический метод определения активности Г6ФДГ и 6ФГДГ с участием НАДФ+ не пригоден для гемолизатов эритроцитов, т.к высокая концентрация гемоглобина в изме-

рительной кювете дает значительное поглощение при длине волны 340 нм. Кроме того, в связи с присутствием в образцах различных окислительно-восстановительных систем результаты измерений не соответствуют реальным величинам. На сегодняшний день предложен колориметрический метод (9) с помощью набора реактивов (Sigma). На наш взгляд он менее чувствителен, чем спектрофотометрический метод. При использовании метода (3) для удаления гемоглобина наблюдались потери ферментативной активности.

Это послужило основанием разработки адекватного способа определения активности Г6ФДГ и 6ФГДГ- ключевых ферментов окислительного звена ПФП, предварительно удалив гемоглобин из гемолизатов и предложить его в качестве диагностического и прогностического теста для раннего выявления гемолитических анемий у с/х животных

Цель: Усовершенствование методов спектрофотометрического определения активности Г6ФДГ и 6ФГДГ в эритроцитах и использовать его как диагностический и прогностический показатель гемолитических анемий у молодняка с/х животных.

Задачи: Разработать способ предварительной обработки гемолизатов эритроцитов с целью удаления гемоглобина и других балластных белков из анализируемых образцов и последующего спектрофотометрического определения активности Г6ФДГ и 6ФГДГ.

Реактивы и оборудование: Ферментативную активность измеряли с использованием следующих реактивов: 0,1М трис HCL буферный раствор pH 7,6, MgCL₂ – 9,2мМ, глюкозо-6-фосфат натрия соль 10мМ, НАДФ + -0,2мМ. Ферментативную реакцию регистрировали в 3 миллиметровой кювете на спектрофотометре Specord UV VIS при длине волны 340нм. Реакцию инициировали добавлением фермента (10).

Результаты и обсуждения: Кровь животного в количестве 0,5-1,0 мл отбирается в центрифужную пробирку (разводится 1:4 на физ.растворе и добавляется 1/10 часть в собираемую кровь) с добавлением гепарина или цитрата натрия (1:4) и центрифугируется в течении 10 минут при 2000 д. Осадок промывается в 3-х кратном объеме охлажденного 0,15М KCL и центрифугируется в том же режиме. Процедура проводится дважды и затем отцентрифугированные эритроциты суспендируют охлажденной дистиллированной водой в соответствии 1:3. Гемолизированные эритроциты центрифугируют 10 мин. При 13000д, остаток отбрасывается. Гемолизаты обрабатывают следующим образом.

Для изготовления мини колонок используются одноразовые шприцы на 2мл, предварительно удалив поршень и закрыть выходное отверстие фильтровальной бумагой. Заполнить км-целлюлозой в объеме 1мл уравновешенной 0,01М трис-HCL буфером pH 7,3 содержащим 0,2мМ MgCL₂. На колонку нанести 0,5мл гемолизата и инкубировать 10 минут. Затем 1-2 минуты центрифугировать. Все процедуры выполняются на

холоде. Полученный препарат, лишенный гемоглобина и др. балластных белков пригоден для спектрофотометрического измерения активности Г6ФДГ и 6ФГДГ, что позволит более точно и быстро характеризовать интенсивность гемолитического процесса в организме.

Заключение: Предлагаемая разработка может найти практическое применение в области энзимотически гемолитических анемий, а также для характеристики ПФП при различных физиологических и патологических состояний, при употреблении некоторых медикаментов, вызывающих гемолиз. Использование Г6ФДГ теста возможно в акушерстве, т.к. на протяжении беременности во время родов и в послеродовом периоде выявляется дефицит эритроцитарной Г6ФДГ. Определенные перспективы открывает определение Г6ФДГ активности в период лактации, которая резко уменьшается после окончания лактации.

Литература

1. Bizzazo M.J., Colson E., Ehrenkranz R. A.// *Pediatr. Clin. North. Am.* 2004 Aug,51 (4): 1087-107
2. Bary-Ce Y., Hongqiong L., Zhensong L. // *Am.J. Hematol.* 2004, Aug, 76(4); 405-12
3. Hennessey M. A., Waltersdorph A.M., Huennekens F. M. // *J. Clin. Invest.* 41.p. 1257-1259
4. Drousitou A., Touma E.H., and al. // *Blood cells mol Dis.* 2004 Jul-Aug. 33.(1) p. 25-30
5. Dhaliwal G., Cornett P.A., Tiemery L.M.Jr. // *Am Fam Physician.* 2004 Jun 1:69 (11):2599-606.
6. Jallon A., Tantular J.S., and al. // *Trop Med Int Health.* 2004 May 9. (5) 615-23
7. Zaffanello M., Rugolotto S., Zambonic G., and al.// *Eur.J.Epidemiol.* 2004: 19(3) 255-7
8. Glock G.E., McLean P.//*Biochem.J.* 1953.55.p.400-408.
9. Khan M.// *J.Coll Physicians. Surg park.* 2004. Jul: 14(7): 400-3
10. Кочетов Г.А. «Практическое руководство по энзимологии». М.: Высшая школа. 1980. 272с.

Резюме

Способы определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы в эритроцитах как ранняя диагностика гемолитических анемий у молодняка с/х животных

Предлагается модифицированный спектрофотометрический метод определения активности Г6ФДГ и 6ФГДГ в качестве теста для раннего выявления гемолитических анемий с с/ животных

Summary

«Method definition activity G-6-P-dehydrogenase and 6-P-G-dehydrogenase in the erythrocyte for early diagnosis of hemolytic anemia in agricultural animals».

A modified spectrophotometric method, is suggested for early diagnosis of hemolytic anemia in agricultural animals that is based on spectrophotometric measurement of G-6-P-dehydrogenase in erythrocytes.