

2. Чернокожев, А. И. Использование растительной кормовой добавки для профилактики болезней телят [Электронный ресурс] / А. И. Чернокожев, Г. М. Топурия. – 2018. – Режим доступа: k-2019-1-2-268-269.pdf. – Дата доступа: 10.02.2025.

УДК 577.158

РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ И ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ АНЕМИЙ У МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Кубышин В. Л.¹, Садовничий В. В.²

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»,

² – УЗ «ГКБ Скорой медицинской помощи г. Гродно»

г. Гродно, Республика Беларусь

Активность ключевых ферментов пентозофосфатного пути (ПФП) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6ФГД) и транскетолазы (ТК) подвержена существенным изменениям в зависимости от возраста, физиологического и патологического состояния животного. Известно, что после родов происходит значительное увеличение активности 6ФГД – в 20 раз, Г6ФД – в 100 раз. При этом возрастает скорость синтеза белков, жирных кислот, происходит значительная активация окисления углеводов в ПФП. Лактационные способности животного обусловлены генетически. При целенаправленном отборе, связанном с определением активности ферментов (ПФП) в эритроцитах, дает возможность прогнозировать молочную продуктивность с/х животных, а также и раннюю диагностику жирности молока. Еще одним из важнейших аспектов исследования изменения активности эритроцитарных ферментов (Г6ФД, 6ФГД) является оценка степени гемолитических анемий у молодняка с/х животных. Исследуемая патология наблюдается в более ранние сроки гемолитического заболевания, чем происходит накопление значительных количеств билирубина в сыворотке крови, что отражает первую фазу ответа организма на гемолизгиперпластическую реакцию костного мозга с выбросом в периферическую кровь незрелых клеток крови.

Вторая, более поздняя фаза является результатом формирования желчных пигментов из освободившегося в процессе распада эритроцитов гемоглобина. Совместное же исследование активности эритроцитарных ферментов и уровня билирубинемии позволяет получить более полное представление о динамике гемолитического процесса. В связи с этим есть основание использовать определение активности ферментов ПФП в качестве диагностического и прогностического тестов. Однако проведенные исследования свидетельствуют, что описанный в литературе (8) спектрофотометрический метод определения активности Г6ФД и 6ФГД с

участием НАДФ не пригоден для гемолизатов эритроцитов, т. к. высокая концентрация гемоглобина в измерительной кювете дает значительное поглощение при длине волны 340 нм. Кроме того, в образцах в зависимости от физиологических состояний присутствует НАДФН оксидазная активность, в результате чего полученные измерения не соответствуют реальным величинам. Следует отметить, что эритроцитарные дегидрогеназы ПФП чувствительны к ингибирующему влиянию НАДФН и АТФ в концентрациях сравнимых с физиологическими. Также известно, что при гемолитической анемии в эритроцитах удается определить лишь 0,1-0,2 % потенциальной активности внутриклеточных дегидрогеназ ПФП. Это может быть связано с высокой величиной K_m для НАД⁺ или же низкой константой ингибирования для НАДФН (9). На сегодняшний день предложен колориметрический метод (10) с помощью набора реактивов (σ). На наш взгляд, он менее чувствителен, чем спектрофотометрический метод. При использовании метода (3) для удаления гемоглобина наблюдались значительные потери ферментативной активности.

Цель – усовершенствование метода спектрофотометрического определения активности Г6ФД и 6ФГД в эритроцитах и использование его как диагностический и прогностический показатель лактационной способности, жирности молока, а также 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 с последующим спектрофотометрическим определением активности Г6ФД и 6ФГД.

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 натриевая соль 10 мМ, НАДФ⁺ 0,2 мМ. Ферментативную реакцию регистрировали в кювете объемом 3 см³ на спектрофотометре Srescord UV VIS при длине волны 340 нм. Реакцию инициировали добавлением испытуемого образца (11).

Результаты и обсуждения: кровь животного в количестве 0,5-1 мл отбирается в центрифужную пробирку (разводится 1 : 4 на физиологическом растворе и добавляется 1/10 часть гепарина или цитрата натрия). Центрифугируется в течение 10 минут при 2000g. Осадок промывается в 3-кратном объеме охлажденного 0,15М KCl и центрифугируется в том же режиме. Процедура проводится дважды, затем центрифугированные эритроциты суспендируют охлажденной дистиллированной водой в соотношении 1 : 3. Гемолизированные эритроциты центрифугируют 10 мин при 1300g, осадок отбрасывается. Гемолизаты обрабатывают на мини колонках следующим образом. Для изготовления мини колонок используются одноразовые шприцы на 2 мл, предварительно удалив поршень и

закрыв выходное отверстие фильтровальной бумагой. Заполнить км-целлюлозой в объеме 1 мл уравновешенной 0,01М трис-HCL буфером рН = 7,3, содержащим 0,2 мМ MgCl₂. На колонку нанести 0,5 мл гемолизата и инкубировать 10 минут при 4 °С. Затем 1-2 минуты центрифугировать. Все процедуры выполняются на холоде. Полученный препарат, лишенный гемоглобина и др. балластных белков, пригоден для спектрофотометрического измерения активности Г6ФД и 6ФГД, что позволит более точно характеризовать активность дегидрогеназ ПФП.

Закключение: предлагаемая разработка может найти практическое применение в области энзимотических гемолитических анемий, а также для характеристики ПФП при различных физиологических и патологических состояниях в результате употребления некоторых медикаментов, вызывающих гемолиз. Использование Г6ФД теста возможно в акушерстве, т. к. на протяжении беременности во время родов и в послеродовом периоде выявляется дефицит эритроцитарной Г6ФД. Определенные перспективы открывает определение Г6ФД активности в прогнозировании жирности молока в период 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. Drouitou 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 Jnt 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. Baksignore A.et.al.//A new hepatic protein inactivating glucost-6-posphate degydrogenase// *Biocem.J.*1968.vol.106.N.1.P.147-154.
10. Khan M.// *J.Coll Physicians. Surg park.* 2004. Jul: 14(7): 400-3
11. Кочетов, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
12. Baksignore A. et.al. // A new hepatic protein inactivating glucost-6-posphate degydrogenase // *Biocem.J.*1968.vol.106.N.1.P.147-154.