

3. Синтетический фитогормон эпибрассинолид может быть использован в качестве биологически активного фактора при получении ранних зародышей вне организма в концентрациях 2×10^{-7} - 2×10^{-9} моль/л, что позволит получать 46,4-55,0% дробящихся клеток и 14,2-16,2% преимплантационных эмбрионов.

Литература. 1. Лебедева, И.Ю. Участие клеток гранулезы в опосредовании действия пролактина и соматотропина на ооцит-кумулюсные комплексы коров *in vitro* / И.Ю. Лебедева, Т.В. Кабардина, Т.И. Кузьмина // *Цитология*. – 2005. - № 10. – С. 882-887. 2. Молекулярная биология клетки. В 5 т. Т.1. / Б. Албертс [и др.]. – М.: Мир, 1987. – 231 с. 3. Колесникова, А.А. Стимуляция развития ооцитов млекопитающих *in vitro* / А.А. Колесникова, В.А. Шагимова // *Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: материалы 6-ой Международной конференции, 19-20 декабря 2006 г., ВИЖ – Дубровицы, 2006*. – С. 85-87. 4. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / под ред. М.В. Зубец, В.П. Буркат. – Киев, 1997. – С. 640-650. 5. Завертяев, Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / Б.П. Завертяев.—Л.: Агропромиздат, 1989.— 255 с. 6. Сметанина, И.Г. Влияние некоторых экзогенных факторов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биологических наук / И.Г. Сметанина. – Боровск, 2001. – 27 с.

УДК 636:612.015

К ВОПРОСУ ОЦЕНКИ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Холод В.М., Баран В.П.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Проанализированы и обсуждены возможности и условия использования биохимических тестов в клинической практике.

Discussed and analyzed are possibilities and condition for using biochemical tests in clinical practice.

Лабораторные биохимические исследования могут оказать существенную помощь в диагностике заболеваний только в случае соблюдения некоторых основных условий:

- Правильной постановки задачи исследования и, в зависимости от этого, выбора соответствующих тестов (показателей).
- Выбора соответствующих целям исследования методов определения изучаемых показателей.
- Квалифицированного технического выполнения биохимических исследований.
- Грамотной оценки результатов и объективности сделанных выводов.

Не секрет, что часто выбор биохимических показателей никак не связан с целью исследования и подбирается по принципу «завось что-нибудь обнаружится» или служит просто неким «украшением», единственной целью которого является создание видимости более глубоких исследований.

Выбор биохимических тестов должен определяться в первую очередь их чувствительностью, специфичностью и селективностью. Под чувствительностью понимают способность теста обнаруживать патологическое состояние. Для его выражения часто используют процент положительных результатов к общему числу исследованных животных с данной патологией. Например, активность аспартатаминотрансферазы оказалась повышена у 20 животных из 25 больных гепатитом (чувствительность $20:25 \cdot 100\% = 80\%$).

Специфичность теста определяется его способностью не давать изменений, характерных для патологического состояния у здоровых животных. Она также может выражаться в процентах. Например, если амилаза не дает высоких значений, характерных для острого панкреатита, ни у одного из исследованных здоровых животных, то специфичность теста 100%.

Под селективностью понимают способность теста давать положительный результат только при наличии конкретного заболевания. Например, фермент орнитинкарбамилтрансфераза вырабатывается только в печени, а трипсин – в поджелудочной железе. Резкое увеличение их содержания в крови свидетельствует о поражении соответственно печени или поджелудочной железы. К сожалению, высокоселективных показателей мало.

Если целью исследования является обнаружение особей, имеющих отклонение от нормы (проведение диспансеризации), то следует выбирать наиболее чувствительные, но малоселективные тесты, такие как, например, содержание гемоглобина, общего белка, СОЭ, снижение щелочного резерва и аналогичные показатели. Наличие таких отклонений говорит о нарушении биохимического гомеостаза, причину которого еще предстоит определить.

Если данные анамнеза и клинического исследования позволяют подозревать какую-то определенную патологию, то цели исследования и выбор показателей должны быть иными. Показатели должны быть специфичными и селективными. Например, существует целый ряд гепатозависимых, панкреозависимых и иных биохимических тестов, которые и должны использоваться при патологии печени или поджелудочной железы. При подозрении на беломышечную болезнь вполне естественно исследовать содержание селена и селенозависимых ферментов, а не калий и натрий и т.д.

Определившись с направлением исследования, необходимо выбрать наиболее подходящие методы их реализации. Выбрав малочувствительный, неспецифический или не связанный с целью исследования метод, трудно получить достоверную информацию. Например, до сих пор в некоторых случаях пытаются получить данные о кислотно-основном балансе крови путем титрования ее кислотой, хотя давно существуют объективные и точные физико-химические методы, позволяющие получить данные обо всех основных компонентах буферных систем крови (pCO_2 , СБО, СБ, БО).

Выбор метода зависит также от целей исследования. Если ставится цель просто обнаружить нарушения фосфорно-кальциевого обмена – достаточно определения Са и Р, если же целью исследования является выяснение механизма нарушения, то этого явно недостаточно, необходимо определять витамин Д и его активные метаболиты, выяснить, в каком звене обмена веществ произошло нарушение, не нарушен ли механизм рецепции.

При существующем обилии методов и методических подходов к изучению одного и того же явления обязательной является оценка возможностей используемого метода или тест-системы. Эта оценка базируется на анализе образцов биологической жидкости (кровь, плазма и др.) с использованием различных статистических методов, но чаще таких статистических величин, как коэффициент вариации или средняя квадратичная ошибка (σ).

Если для оценки используют коэффициент вариации, то обычно исследуют 15-20 контрольных образцов с высоким, средним и низким содержанием исследуемого компонента. Если при расчете коэффициента вариации его численное значение превышает 10%, то методом при проведении точных количественных измерений лучше не пользоваться, хорошим результатом является 2% и меньше.

Если используют среднее квадратичное отклонение (ошибку), то исследуют 15-20 образцов одного и того же контрольного материала. Если за пределы 2σ выходит значение только одной пробы, то качество метода (при правильном его выполнении) считается хорошим и пригодным к использованию, если 2 и больше проб – как неудовлетворительным.

Техника выполнения лабораторных исследований предполагает не только хорошее знание методики и неукоснительное ее выполнение, но и нивелирование случайных ошибок путем одновременного проведения по меньшей мере двух параллельных проб. Если при этом разница между двумя параллельными определениями превышает четыре квадратичных отклонения ($x_1 - x_2 > 4\sigma$), то результат считается неудовлетворительным и пересдывается.

С целью повышения точности определения в тех случаях, где это необходимо (например, при использовании титриметрических методов) ставят контрольный опыт. Он заключается в проведении всех операций, предусмотренных методикой в отсутствие определяемого компонента. Данные контрольного опыта учитывают при расчете результатов определения.

Не менее важным этапом клиничко-биохимических исследований является оценка результатов и выводы, которые можно сделать на основании этих исследований. И здесь очень важным моментом является вопрос «нормы», «нормативных физиологических значений» и других аналогичных терминов, которые должны как-то обозначить границы, характерные для клинически здоровых особей. Эти данные приводятся обычно в различных справочных изданиях (1, 2, 3, 4, 5).

В настоящее время мы не имеем законодательно установленных норм референтных значений, которыми нужно было бы в обязательном порядке руководствоваться при проведении биохимических исследований. Отсутствие подобного ГОСТа затрудняет интерпретацию полученных данных, однако введение его мало что даст, и не только в силу того, что в нем по ряду объективных причин будет много неточностей и спорных моментов (а в случае недостаточно тщательно подготовленного документа и грубых ошибок). Можно, конечно, границы колебаний ограничить значениями, явно несовместимыми с жизнью (например, рН крови теплокровных животных 5,5 и т.д.), однако в этом случае теряется и смысл «нормы», так как сюда войдут значения, характерные для патологии. Можно значение «нормы» отработать на какой-либо большей или меньшей группе клинически здоровых животных. Но в этом случае всегда есть вероятность, что часть нормальных физиологических значений окажется за ее границами. В некоторых случаях улучшить ситуацию пытаются введением таких понятий, как «расширенные границы нормы» (например, в Германии). Содержание глюкозы в крови человека дается в границах 4,16-5,27 ммоль/л, однако тут же в соседней графе приводятся «расширенные границы нормы» - 2,5-6,38 ммоль/л (6).

Необходимо также учитывать, что все время появляются новые, более совершенные методы, процесс автоматизируется и компьютеризируется. В основу работы биохимического автомата может быть положен тот или иной принцип (поточный, дискретный), компьютерная программа может быть недостаточно отработанной, биохимическая матрица у различных автоматов может быть различной. Все это будет влиять на границы нормы.

Как в данной ситуации выходить из положения? Во-первых, при проведении научных исследований, как правило, проводится сравнительный анализ и формируется контрольная группа. Однако для производственных исследований этот вариант не подходит. Наиболее оптимальным результатом в этом случае является создание собственной базы данных каждой лабораторией с учетом того оборудования (биохимических автоматов) и тех методов исследования, которые в ней используются. Если для одного и того же показателя используются различные методы или оборудование, обязательным является проведение сравнительных исследований с выводом поправочных коэффициентов и методики пересчета. Поправочные коэффициенты и методика пересчета должны вводиться и в тех случаях, когда влияние условий является постоянным и однозначным (возраст, беременность, сезон года и др.).

Особенно сложно обстоит дело с установлением нормы для ферментов и гормонов. Некоторые авторы считают, что для них ее вообще не следует устанавливать и каждая лаборатория должна иметь свои собственные значения, выведенные с учетом конкретных методов и условий, принятых в данной лаборатории (4). Унификация путем введения международной единицы (МЕ) – (превращение 10^6 моль/мин) или катала (превращение 1 моль/сек) далеко не решает вопросы унификации. Определение одних и тех же ферментов может вестись при различной температуре, величине рН, концентрации субстратов, с использованием активаторов или без них и др. Существуют дневные и суточные биологические ритмы, которые тоже сказываются на результатах.

Для иллюстрации сказанного в таблице представлены данные по некоторым клиничко-биохимическим показателям, приведенным в различных изданиях.

Таблица — Биохимические показатели крови крупного рогатого скота

Показатель	Единицы	Источник 1		Источник 2		Источник 3	
		Границы колебаний	Разница	Границы колебаний	Разница	Границы колебаний	Разница
Глюкоза	ммоль/л мкмоль/л	1,32-4,89	3,57	2,2-3,8	1,6	2,36-5,11	2,75
Аспаратами- нотрансфераза	ммоль/л мккат/л	0,18-2,66	2,48	0,2-3,0	2,8	0,11-0,69	0,58
Аланинами- нотрансфераза	ммоль/л мккат/л	0,02-1,0	0,98	0,2-2,5	2,3	0,07-0,58	0,51
Щелочная Фосфатаза	мккат/л	0,04-2,7	2,3			0,54-1,28	0,74
Гаммаглута- милтрансфераза	мккат/л	0,11-0,48	0,37			0,05-0,31	0,26
Кальций	ммоль/л мкмоль/л	1,62-3,37	1,75	2,2-3,3	1,1	0,29-4,18	3,89
Фосфор неорг- анич	ммоль/л мкмоль/л	0,81-2,72	1,91	1,4-2,5	1,1	0,22-7,05	6,83
Магний	ммоль/л	0,53-1,64	1,11			0,36-3,2	2,84
Медь	мкмоль/л мкг% мкг/л	6,28-24,3	18,02	80-110	30	266,8-1419,8	1153
Цинк	мкмоль/л мкг% мкг/л	15,3-33,7	18,4	300-500	200	0,97-7,74	6,77
Холесте- рин общий	ммоль/л мкмоль/л	0,67-2,88	2,21	3,5-6,5	3,0	0,22-8,71	8,49
Триглице- риды	ммоль/л	0,03-0,55	0,52-	-	-	0,135-13,41	13,275
Аскорбиновая кислота	ммоль/л	0,015-0,086	0,071			0,015-0,066	0,051
Витамин А	мкмоль/л ммоль/л мкг%	0,46-6,3	5,84	0,7-4,8	4,1	119,1-716,2	597,1

Источники: 1. Справочник по ветеринарной биохимии. 1986, (1).

2. Физиологические показатели обмена веществ у различных видов с.-х животных и птиц, 2000 год, (2).

3. Материалы кафедры химии ВГАВМ, 2007-2009, (3).

Из таблицы видно, что и до настоящего времени в ряде случаев не используются единицы СИ (там, где это возможно и нужно). Так, например, медь и цинк в разных изданиях выражены в мкмоль/л, мг% и мкг% (СИ – мкмоль/л). Это приводит к тому, что один и тот же показатель выражается в различных единицах, что затрудняет сравнительный анализ и использование данных в клиничко– биохимических целях.

Данные ферментов выражать просто в ммоль/л некорректно, так как не ясно, за какой временной промежуток произошло превращение субстрата (в этом достоинство МЕ и катала). В некоторых случаях имеет место неправильное использование приставок (источник 2).

Если говорить о границах колебаний, то интересно проанализировать данные источника 1 и источника 3. Данные источника 1 получены на основе большого числа животных, но находящихся в очень различных условиях (различные страны). Данные источника 3 получены на меньшем числе животных, но находящихся в близких условиях (Витебская область).

Разница между максимальными и минимальными значениями иногда больше в первом случае, иногда – во втором, что говорит о том, что на разбегку результатов в одних случаях большее влияние оказывают внешние условия, в других – индивидуальные особенности животных.

И в том и в другом случае колебания довольно значительные, что создает определенные трудности в интерпретации полученных данных. Поэтому окончательную оценку и выводы из проведенных исследований следует делать только комплексно, с учетом клинических, анамнестических данных, инструментальных и других специальных исследований.

Заключение. С целью унификации клиничко–биохимических исследований необходимо придерживаться следующих правил:

Система СИ принята повсеместно и полученные результаты должны выражаться в единицах этой системы. Международная федерация по клинической химии рекомендовала перейти на эти единицы еще в 1973 году.

Количество вещества, если известна его молекулярная масса, должно выражаться только в молях или кратных единицах (ммоль, мкмоль, нмоль и т.д.). Не следует одновременно с единицами СИ приводить и внесистемные единицы, так как период адаптации к системе СИ давно прошел.

Если неизвестна молекулярная масса, обычно используется массовая процентная концентрация и соответствующие кратные единицы (г%, мг%, мкг% и др.).

Если определяется смесь веществ и результат выражается в молях (например, кетоновые тела), то обязательно указание, по какой молекулярной массе ведется расчет.

Активность ферментов должна выражаться в МЕ или каталах. Если используются другие единицы, в методике необходимо приводить условия определения.

Если используются неформальные единицы, ссылка на метод обязательна (например, тимоловая проба).

Однако соблюдение этих правил в силу всего вышесказанного далеко не исчерпывает возможностей унификации. Любая аккредитованная лаборатория, занимающаяся систематическими исследованиями в области клинической биохимии, должна иметь собственный банк данных, используемый в качестве физиологической нормы.

Литература. 1. Холод, В.М. Справочник по ветеринарной биохимии / В.М. Холод, Г.Ф. Ермолаев – Минск: «Ураджай», 1988.-168с. 2. Камылиников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камылиников. -Минск: «Беларусь», 2000.- т 1-2.-960с. 3. Физиологические показатели обмена веществ у различных видов сельскохозяйственных животных и птиц / Б.Я. Бирман, В.С. Литвяк.- Минск: БелНИИЭВ, 2000.-62 с. 4. Липперт, Г. Международная система единиц в медицине / Г. Липперт – М.: Медицина, 1980.-208с. 5. Справочник клинико – биологических показателей животных / Н.С. Мотузко и др.- Горки, 2001.-64 с. 6. Биохимические показатели, соответствующие норме. Вопросы гематологии в цифрах и фактах. // Медицинские новости .-1997-№2.-с.5-16

УДК 636.2:612.646

РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПОДДЕРЖАНИИ ПЛЮРОПОТЕНТНЫХ СВОЙСТВ РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Шейко И.П., Ганджа А.И., Симоненко В.П., Леткевич Л.Л., Ракович Е.Д.*, Мотузко Н.С.**

*РУП «Институт животноводства НАН Беларуси», г. Жодино,

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

В результате лабораторных исследований установлено, что в качестве биологически активных веществ к базовой синтетической питательной среде ТС-199 необходимо добавлять следующие компоненты: фетальную сыворотку теленка – 15%, пирувата натрия – 0,2 мг/мл и лактата кальция – 0,6 мг/мл. Применение данной среды позволит получать до 38,2% дробящихся зародышей от общего количества ооцитов, поставленных на культивирование. При этом выход эмбрионов, пригодных для трансплантации, составит 20,5% от количества дробящихся клеток.

As a result of laboratory researches it is established, that as biologically active substances to base synthetic nutrient medium TC-199 it is necessary to use following components: fetalnyy whey telenka – 15 %, piruvata sodium – 0,2 mg/ml and lactata calcium – 0,6 mg/ml. Application of the given environment will allow to receive up to 38,2 % of splitted up germs from total oocitov, put on kultivirovanie. Thus the output of embryos, suitable for transplantation will make 20.5 % from quantity of splitted up cells.

Введение. Важнейшим ресурсом повышения эффективности производства сельскохозяйственной продукции, в том числе продуктов животноводства, являются технологии, основанные на последних достижениях сельскохозяйственной и биологической науки. В условиях интенсификации производства продуктов животноводства создается предпосылка быстрой потери существующего генофонда за счет выбраковки высокоценных животных по разным производственным причинам. Поэтому биотехнология размножения или репродуктивная биотехнология, открывая новые возможности ускорения селекционных процессов за счет воспроизведения высокоценных генотипов животных, приобретает все большее значение в сельском хозяйстве как в нашей стране, так и за рубежом. Особое значение репродуктивная биотехнология имеет в разведении и селекции крупного рогатого скота, как одного из видов малоплодных животных. Принимая во внимание тот факт, что количество ооцитов в яичниках коров достигает нескольких сот тысяч при реализации за продуктивную жизнь 2-5, разработка принципиально новых технологий ускоренного размножения племенных животных вносит огромный вклад в быстрый генетический прогресс, наблюдаемый в последние десятилетия. Оплодотворение in vitro или экстракорпоральное оплодотворение — относительно новый метод в размножении сельскохозяйственных животных. Он существенно повышает возможности для сохранения и ускоренного размножения выдающихся животных, а также животных исчезающих видов и пород, представляющих собой большую генетическую ценность, и сочетает в себе культивирование ооцитов, полученных из яичников убитых на мясокомбинате самок, оплодотворение их вне организма и трансплантацию полученных таким образом эмбрионов реципиентам. Эмбрионы, полученные в результате созревания и оплодотворения in vitro, имеют относительно низкую стоимость, обусловленную дешевизной источника получения материала (яичники убитых животных) и минимальным использованием