

## Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2

действие препарата связано с нормализацией кишечного пищеварения за счёт абсорбции токсинов и стимуляции симбионтной микрофлоры.

Таблица 6. Активность некоторых ферментов в сыворотке крови телят, больных абомазоэнтеритом (M ± m, P)

| Показатели               | Дни исследования | Контроль      | Опыт          |
|--------------------------|------------------|---------------|---------------|
| АлАТ, МЕ/л               | В начале опыта   | 28,33± 2,105  | 29,52± 1,827  |
|                          | В конце опыта    | 26,65± 2,351  | 26,82± 3,431  |
| АсАТ, МЕ/л               | В начале опыта   | 55,27± 18,358 | 75,38± 23,564 |
|                          | В конце опыта    | 29,91± 4,446  | 34,21± 11,521 |
| g-ГТФ, МЕ/л              | В начале опыта   | 57,4± 21,77   | 89,9± 22,94   |
|                          | В конце опыта    | 31,4± 4,21    | 49,4± 15,67   |
| Щелочная фосфатаза, МЕ/л | В начале опыта   | 255,3± 43,78  | 239,9± 29,52  |
|                          | В конце опыта    | 33,9± 1,73**  | 31,4± 1,64*** |

Примечание: \*\*, \*\*\* – степень достоверности P < 0,01, 0,001.

Проведенный эксперимент по применению препарата Лактофильтрум в комплексном лечении гастроэнтеритов телят показал, что лечебная его эффективность – 100 %. Экономическая эффективность на 1 рубль затрат составила в контрольной группе 1,63 руб, в опытной 3,52 руб.

Использование сорбента лактофильтрум для лечения больных абомазоэнтеритом телят является экономически выгодным.

**Список использованной литературы.** 1. Абрамов, С.С. Терапевтическая эффективность ранитидина при лечении телят, больных абомазоэнтеритом / С.С. Абрамов, Н.Н. Шабусов, В.И. Кряклина, И.В. Шарлан // *Международный вестник ветеринарии*. – 2007. – № 1. – С. 56 – 58. 2. Бодяковская, Е.А. Показатели естественной резистентности крови телят на фоне применения фитосорбента СВ-2 / Е.А. Бодяковская // *Современные вопросы патологии сельскохозяйственных животных : материалы международной научно-практической конференции / Институт экспериментальной ветеринарии им. Вышеселского*. – Минск, 2003. – С. 65 – 66. 3. Бодяковская, Е.А. Применение фитосорбента в комплексной терапии телят, больных гастроэнтеритами / Е.А. Бодяковская, Е.А. Панковец // *Ветеринарная медицина Беларуси*. – 2002. – № 2. – С. 31 – 33. 4. Гастроэнтеральная патология и реабилитация больных животных / В.В. Малашко [и др.] // *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : материалы международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию зооинженерного факультета и памяти почетного профессора БГСХА П.И. Шумского (г. Горки, 23-24 июня 2000 г.)* – Горки, 2000. – С. 242 – 245. 5. Карпуть, И.М. Витаминно-минеральный препарат селевит в повышении резистентности и профилактике гастроэнтеритов у телят / И.М. Карпуть, С.Л. Борознов // *Экологические проблемы патологии, фармакологии и терапии животных : материалы Международного координационного совещания, 19-23 мая 1997 г. / Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии*. – Воронеж, 1997. – С. 318 – 319. 6. Лапина, В.А. Средства эфферентной терапии при гастроэнтеритах телят / В.А. Лапина, Е.А. Панковец, Е.А. Бодяковская // *Ветеринарная медицина Беларуси*. – 2004. – № 2. – С. 8 – 10. 7. Морозов, Д.Д. Применение адсорбента энтеросгель для терапии больных гастроэнтеритом телят / Д.Д. Морозов, С.С. Абрамов // *Ветеринарная медицина Беларуси*. – 2001. – № 2. – С. 31 – 32. 8. Рекомендации по лечению гастроэнтеритов у телят и поросят с использованием натрия гипохлорита и энтеросорбента энтеросгеля / ВГАВМ. – Витебск, 2002. – 17 с. 9. Web-сайт: <http://www.leksir.ru/cat.htm>

УДК 577.112 : 573.6: 636

#### КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ФИТОЛЕКТИНОВ С УГЛЕВОДНЫМИ ДЕТЕРМИНАНТАМИ ЭРИТРОЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И $\alpha$ 1-4 D-ГЛЮКАНОМ

\*Кубарев В.С., \*Добровольский С.А., \*Шишлов М.П. \*\*Курдеко А.П., \*\*Коваленок Ю.К.

\* РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию», Республика Беларусь 222160

\*\* УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», Республика Беларусь 210026

Результатом проведенных исследований явилась сравнительная характеристика гемагглютинирующей активности фитолектинов некоторых бобовых и зерновых культур по отношению к эритроцитам крупного рогатого скота и преципитирующая с  $\alpha$  1-4 D-глюканом. Интенсивная преципитация  $\alpha$  1-4 D-глюкана наблюдалась при его взаимодействии с лектинами сои и пшеницы, и менее выраженная—при взаимодействии с лектинами фасоли и ячменя. Установлено, что основным структурным элементом гликокалекса эритроцитов, который детектируют фитолектины сои, фасоли, пшеницы и ячменя, являются мономеры глюкозы или ее производные.

In the article the results of some fitelectins with erythrocytes and  $\alpha$  1-4 D-glucane interaction had been compared.

The result of conducted researches was the comparative characteristic of legumes and cereal fitelectins hemagglutinin activity with regard to erythrocytes of cattle and precipitating with  $\alpha$  1-4 D-glucane. Intensive  $\alpha$  1-4 D-glucane precipitation was while interaction with lectins of soy and wheat and less with haricot and barley

It has been established that the main core of erythrocytes' glykokalex that detecting fitelectins of soy, wheat, haricot and barley are monomers of glucose and its derivatives.

**Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2**

**Введение.** Для успешного решения актуальных вопросов производства животноводческой продукции, необходимы глубокие исследования в области биохимии в целом и молекулярной биологии в частности. Прогресс и достижения в этой области науки тесно связаны с развитием новых методов исследований. Одним из них является изучение белков-лектинов.

Лектины тесно связаны с исследованием структуры и функций клеточных мембран, что важно при проведении различных биотехнологических работ, а также изучения патологических состояний (нарушение клеточного метаболизма, трансформация и разрушение клеток и т.д.) [1,2,3,4].

Лектины, входя в структуру тканей растений, микроорганизмов, животных, принимают участие в регулировании их метаболизма, а также в защите от некоторых агентов внешней среды. С другой стороны, лектины, будучи выделенные из живых объектов, являются ценными биохимическими реагентами, использование которых перспективно в экспериментальной цитохимии, в диагностике и лечении некоторых болезней животных, в биотехнологических процессах выделения некоторых сложных углеводовсодержащих веществ.

В основе биологической активности лектинов лежит их способность к комплексообразованию. В таком комплексе сам лектин является ядром, а лигандами выступают углеводные детерминанты цитоплазматических мембран и стенок клеток, капсидов и суперкапсидов вирусов, а также другие углеводы [5,6,7].

**Цель работы** – изучить взаимодействие фитолектинов с эритроцитами крупного рогатого скота и  $\alpha$  1-4 D глюканом.

**Материалы и методика исследований.** Для проведения эксперимента использовали семена сои сорта Вилия, фасоли белой – Ольга, ярового ячменя – ВМ-МГФ, пшеницы Акогомуги. Семена тонко размалывали, и для выделения лектинов использовали метод солевой экстракции [5]. Полученные экстракты хранились при температуре -18 С.

Сравнение комплексообразующей активности взаимодействия лектинов с углеводами системы гликокалекса эритроцитов проводилось с использованием эритроцитарной тест-системы полученной из цельной крови крупного рогатого скота.

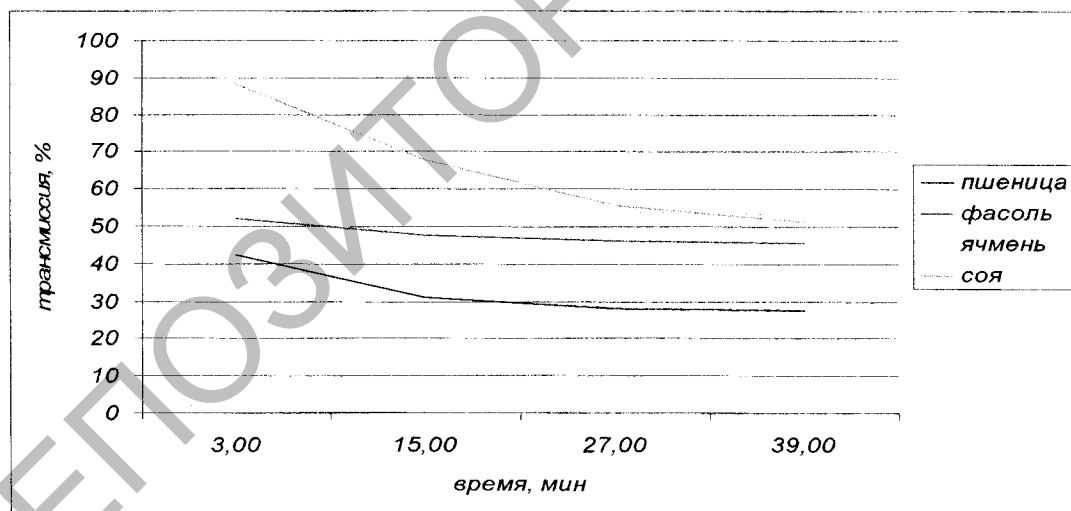
Эритроцитарная тест-система бралась в концентрации форменных элементов  $12,4 \cdot 10^{12}/л$ . Подсчет эритроцитов проводился в камере Горяева.

Реакция гемагглютинации, вызванная фитолектинами семян, фиксировалась на спектрофотометре Helios Alfa and Beta (Великобритания) в режиме турбодиметрии при фиксированной длине волны 420 нм [8,9,10,11,12,13]. Турбодиметрия реакционной смеси проводилась на протяжении 40 минут.

Статистическая - математическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием программного обеспечения спектрофотометра и пакета программ Microsoft office персонального компьютера.

Глюкозная специфичность лектиновых белков определялась по модифицированному методу I.J. Goldstein гаптенного ингибирования реакции преципитации исследуемого лектина с полисахаридами [14], с применением йод-крахмальной тест – системы [11].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Результаты турбодиметрии суспензии эритроцитов после добавления экстрактов лектинов различных культур, после программной обработки были представлены графически:



**Рисунок 1.** Кривые гемагглютинации по результатам турбодиметрии

Разница в способности лектинов формировать комплексы с эритроцитами, обусловлена разным пространственным соответствием углеводных доменов лектинов семян используемых в эксперименте сельскохозяйственных культур и распознаваемыми ими углеводными детерминантными участками антигенного комплекса системы гликокалекса эритроцитов.

Снижение пропускной способности эритроцитарной взвеси с 88 % до 51% т.е. на 37% или в 1,72 раза, в течение 40 минут свидетельствует о высокой интенсивности реакции агглютинации эритроцитов лектинами сои. Интенсивное падение светопропускной способности эритроцитарной суспензии наблюдалось с первых минут эксперимента и продолжалось до 30-ой минуты турбодиметрии. Затем наклон кривой гемагглютинации несколько уменьшается, что свидетельствует о снижении интенсивности гемагглютинации. Однако и на последней минуте эксперимента с использованием лектинов семян сои кривая гемагглютинации имеет незначительный наклон к оси абсцисс. Это позволяет сделать выводы о том, что к концу эксперимента, в реакционной смеси все

## Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2

еще существуют активные молекулы лектина способные к дальнейшей реакции гемагглютинации.

Падение пропускной способности суспензии эритроцитов на протяжении 40 мин. эксперимента после добавлении лектинов из семян пшеницы произошло с 42 до 27 %, т.е. в 1,55 раза. Такое падение светопропускной способности также высокое, и характеризует высокую комплексообразующую активность лектинов пшеницы по отношению к углеводным детерминантам гликокалекса эритроцитов. Лектины ячменя оказались менее специфичны к эритроцитам крупного рогатого скота. Падение светопропускной способности – с 61 до 53% – т.е. в 1,15 раза характеризует их низкую гемагглютинирующую активность.

Лектины фасоли белой, как ни странно, также показали низкую гемагглютинирующую активность. Образование агрегатов вызвало падение светопропускной способности взвеси эритроцитов при добавлении лектинового экстракта семян фасоли с 52 до 45 % – в 1,15 раза соответственно. В тоже время в мировой литературе приводятся сведения о высоком содержании лектинов в семенах этой культуры. Низкую агглютинацию эритроцитов крупного рогатого скота лектинами фасоли можно объяснить специфичностью углеводов гликокалекса эритроцитов, к которым углеводсвязывающие участки доменных структур лектина имеют невысокое пространственное соответствие.

Выход кривых гемагглютинации на плато через полчаса после начала эксперимента (кроме кривой гемагглютинации лектинами сои) и отсутствие дальнейшего падения светопропускной способности взвеси эритроцитов показывает отсутствие агглютинации в реакционной смеси. Это можно объяснить тем, что в результате комплексообразования при связывании лектина с углеводными детерминантами эритроцитов в реакционной смеси не осталось активных, свободных от углеводных лигандов молекул лектина.

#### Оценка ген-специфичности лектинов с $\alpha$ 1-4 D глюканом йод-крахмальной тест-системы.

Для определения взаимодействия лектинов с крахмалом была приготовлена йод-крахмальная тест-система [3]. Для ее приготовления к приготовленному желатинизированному прозрачному раствору крахмала был прилит 0,5% раствор йода в объеме 0,3 мл. В результате чего приготовленный йод-крахмальный комплекс приобрел насыщенный интенсивно синий цвет.

Йод-крахмальный комплекс была разлит по 16 пробиркам в объеме 3 мл. Каждые четыре пробирки из 16 использовались для определения глюкозоспецифичности лектинов одного из исследуемых экстрактов.

В партию по четыре пробирки приливали последовательно разведенные дистиллированной водой исследуемые лектиновые экстракты в соотношении 1/1; 2/1; 4/1. Контролем служил йод-крахмальный комплекс с прилитым к нему дистиллированной водой в таких же объемах, в которых вода приливалась в экстракты. Инкубация проводилась при температуре 20°C на протяжении трех часов.

Оценка активности лектинов по комплексообразующей способности взаимодействия с крахмалом проводилась по общепринятой методике в крестах.

Таблица. Взаимодействие фитолектинов с  $\alpha$  1-4 D глюканом

| Культура | Последовательное разведение |         |         |       |
|----------|-----------------------------|---------|---------|-------|
|          | экстракт                    | 1/1     | 2/1     | 4/1   |
| Соя      | + + + +                     | + + + + | + + + + | + + + |
| Пшеница  | + + +                       | + + +   | + + +   | + +   |
| Фасоль   | + +                         | + +     | + +     | + +   |
| Ячмень   | +                           | -       | -       | -     |

- + - обесцвечивание раствора незначительно, осадка практически не наблюдается;
- + + - сильное обесцвечивание раствора, в растворе наблюдается интенсивная муть;
- + + + - полное обесцвечивание раствора, хлопья на дне пробирки и в супернатанте;
- + + + + - полное обесцвечивание раствора с формированием мощного слоя осадка.

Из таблицы видно, что изучаемые лектины сельскохозяйственных культур обладают различной комплексообразующей активностью по отношению к крахмалу являющимся основным компонентом используемой тест-системы. Так как йод-крахмальная тест-система служит для определения глюкозоспецифичности лектинов, то можно сделать заключение о том, что лектины различных сельскохозяйственных культур изучаемых в эксперименте имеют различную аффинность к глюкозе.

Наиболее интенсивное комплексообразование наблюдалась при взаимодействии с глюкозными мономерами крахмала лектинов сои, преципитация в этом случае составила 4+. Снижение концентрации лектинов за счет разведения лектинового экстракта дистиллированной водой даже в объеме ¼ влияния на комплексообразующую активность белков данного класса не оказало. Лектины семян пшеницы также оказались активными преципитинами тест-системы. Однако при разведении экстракта ¼, как в случае с лектинами сои, наблюдалось незначительное изменение активности лектинов. Если при использовании экстракта лектинов пшеницы разведенного дистиллированной водой в соотношении 1/1 и ½ активность лектинов составила 3+, то при использовании разведения ¼ преципитация составила 2+. Фасоль проявила менее выраженную лектиновую активность по сравнению с двумя предыдущими образцами лектинов. При разведении экстракта лектинов фасоли как в соотношении 1/1 так и в ¼ изменения активности в осадении крахмала не наблюдалась. Комплексообразующая активность, проявляющаяся в виде формирования преципитата, составила в обоих случаях 2+. Наиболее низкая комплексообразующая способность наблюдалась при исследовании глюкозоспецифичности лектинов семян ячменя. Так при исследовании экстракта семян ячменя содержащего максимальную концентрацию лектинов преципитация составила всего лишь 1+. При экспериментальном разведении экстракта преципитирующая активность лектинов ячменя визуально не фиксировалась. В контроле изменений не происходило, растворы оставались цветные и прозрачные.

Проведенные исследования с использованием йод-крахмального комплекса показывают, что самую высокую аффинность и avidность к глюкозе имеют лектины семян сои и пшеницы. Значительно более низкое про-

**Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2**

пространственное соответствие к глюкозе у глюкозоузнающих доменов лектинов семян ячменя и фасоли. Следует отметить, что незначительное обесцвечивание йод-крахмального клатратного комплекса в случае использования в качестве преципитина лектинов ячменя косвенно указывает на наличие в экстракте семян моновалентных лектинов. Такие лектины, в свою очередь, не способны к осаждению глюкозных полимеров, однако при этом могут менять пространственную конфигурацию йод-крахмального клатратного комплекса, высвобождая или экранируя ионы йода, что приводит к изменению интенсивности окраски используемого в качестве лиганда йод-крахмального комплекса. Таким образом полученные данные позволяют сделать заключение о том, что лектины ячменя способны сорбироваться на глюкозных детерминантах эритроцитов крупного рогатого скота не вызывая значительную агрегацию последних.

При сопоставлении результатов полученных в ходе турбодиметрии взаимодействия лектинов исследуемых культур и суспензией эритроцитов, а также постановке реакции комплексобразования между лектинами сельскохозяйственных культур и крахмалом йод-крахмального комплекса проявляющейся в виде серологической реакции преципитации, наблюдается схожесть в интенсивности обеих типов реакций.

Высокая гемагглютинирующая и преципитирующая активность лектинов сои и пшеницы, менее выраженная у фасоли и низкая у лектинов семян ячменя позволяет сделать выводы о том, что данные фитогемагглютинины в обоих случаях распознают схожие углеводные участки. Соответственно углеводом, оказывающим основное влияние на формирование агрегатов эритроцитов крупного рогатого скота, который выступает лигандом при взаимодействии с лектинами семян сои и пшеницы является глюкоза, а также ее производные.

**Заключение.** В результате проведенных исследований дана сравнительная характеристика гемагглютинирующей активности фитолектинов некоторых бобовых и зерновых культур по отношению к эритроцитам крупного рогатого скота и преципитирующая с  $\alpha$  1-4 D-глюканом. Интенсивная преципитация  $\alpha$  1-4 D-глюкана наблюдалась при его взаимодействии с лектинами сои и пшеницы, и менее выраженная при взаимодействии с лектинами фасоли и ячменя.

Установлено, что основным структурным элементом гликокалекса эритроцитов, который детектируют фитолектины сои, фасоли, пшеницы и ячменя являются мономеры глюкозы или ее производные.

**Литература.** 1. Игнатов, В.В. Углеводоузнающие белки-лектины / В.В. Игнатов // Соросовский образовательный журнал. –1997.– №2.– С.14–20. 2. Луцук, А.Д. Лектины / Е.Н. Панасюк, М.Д. Луцук.– Львов: Выща школа, 1981. –С.156 3. Луцук, А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д. Луцук, Е.С. Детюк, М.Д. Луцук. Львов: Выща школа, 1989. –С.142 4. Лахтин, В.М. Лектины – регуляторы метаболизма /В.М. Лахтин// Биотехнология. 1986 –№ 6. –С.66–69. 5. Кубарев, В.С. Изучение реакции агглютинации лектинов зерновых и бобовых культур с микроорганизмами- возбудителями желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных. / В.С. Кубарев, М.П. Шишлов // Известия Национальной Академии Наук, –2006.– №5.– С.105–107 6. Кубарев, В.С. Перспективы использования лектинов бобовых культур в медицине, ветеринарии и селекции. / В.С. Кубарев, С.А. Добровольский, М.П.Шишлов // Роль молодых ученых в развитии науки: материалы науч.-практ. конф., Великие Луки, 9-12 апреля 2007. –С. 106-112 7. Кубарев, В.С. Определение детерминант – специфичности микроорганизмов вида *Chlamidia psittaci* и вирусов-возбудителей желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных с помощью фитолектинов, содержащихся в экстрактах бобовых культур материалах конференции / В.С.Кубарев, П.А. Красочко, С.А. Добровольский, М.П. Шишлов / Биоресурсы и вирусы; мат. междунар. конференц. 10-13 сентября 2007г. / Киевский нац. универ. им. Т. Шевченко – а.Киев, 2007 8. Арора, С.К. Химия и биохимия бобовых растений / С.К.Арора; перевод с англ. Спектров К.С.– Москва; Агропромиздат, 1986.–С.. 222-225 9. Самаль А.Б., Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. / А.Б.Самаль, Мн., 1990. 10. Губен- Вейель. Методы органической химии: в 6т. / Губен- Вейель.– Москва: Химия, 1967. –6 т. 11. Кубарев, В.С. Лектины семян зерновых и зернобобовых культур и оценка их гемагглютинирующей активности. / В.С. Кубарев, С.А. Добровольский, И.Н. Мисник, М.П. Шишлов // Приложение к журналу Известия Национальной Академии Наук. Биологическая серия 2008г. 12. Ляликов, Ю.С. Физико-химические методы анализа. / Ю.С.Ляликов.– Москва: Химия 1964. –128–246 с. 13. Булатов, М.И., Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа: учебн. пособие./ М.И. Булатов, .И.П. Калинин. –Ленинград: Химия, 1972. 14. Голдштейн, И.Дж. Использование конканавалина А в структурных исследованиях / И.Дж. Голдштейн, Методы исследования углеводов Москва: Мир, 1975 – С. 88-99 Пер.с англ В.А.Несмеянова Под редакц. А.Я. Хорлина

УДК 619:616.98:579.882.11:636.2

### **К ВОПРОСУ ДИАГНОСТИКИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ФОРМЫ ХЛАМИДИОЗА У КОРОВ В УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ.**

**Кузьмич Р.Г., Кралько Л.В.**

УО Витебская «ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь, 20026

*Проведя аналитический обзор последних публикаций, проанализировав результаты собственных исследований, сделаны выводы о диагностике генитальной формы хламидиоза у коров.*

*Having lead the state of the art review of last publications, having analysed results of own researches, conclusions about diagnostics gynecologic pathology forms of a clamidiosis at cows are made.*

**Введение.** Значительный удельный вес хламидиозов в патологии человека и животных определяет необходимость разработки и совершенствования методов диагностики данных заболеваний. Решающее значение в выявлении хламидийных инфекций имеют методы их лабораторной диагностики.

Хламидии - это микроорганизмы, которым присущи некоторые особенности, важные для диагностики этих инфекций: они, как и вирусы, внутриклеточные паразиты, не размножаются вне клеток макроорганизма человека и животных; имеют уникальный цикл развития, формируя в цитоплазме клеток включения; в процессе