

На правах рукописи

УДК 619 616-085 636 1(043 3)

Шатилов Алексей Владимирович

**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА КРОВИ
ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛОШАДЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЁГКИХ**

16 00 01 – диагностика болезней и терапии животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук



Москва 2008 г

Работа выполнена на кафедре внутренних незаразных болезней животных
ФГОУ ВПО Московской Государственной Академии ветеринарной
медицины и биотехнологии имени К И Скрябина

Научный руководитель: заслуженный деятель науки РФ,
доктор ветеринарных наук,
профессор
Коробов Александр Васильевич

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук,
профессор
Паршин Павел Андреевич,

заслуженный деятель науки РФ,
доктор ветеринарных наук, профессор
Папуниди Константин Христофорович

Ведущая организация ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская
Государственная Академия
ветеринарной медицины»

Защита диссертации состоится «12» ноября 2007 г
в 16⁰⁰ час на заседании диссертационного совета Д220 042 02
при ФГОУ ВПО Московской Государственной Академии ветеринарной
медицины и биотехнологии имени К.И Скрябина по адресу 109472, г.
Москва, ул Академика Скрябина, д 23; т 377-93-83

Автореферат разослан «10» октября 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



А.И Торба.

1. Общая характеристика работы

1.1. Актуальность проблемы. Изучение клинического аспекта процесса цепного свободнорадикального перекисного окисления липидов – одна из актуальных проблем ветеринарной медицины. Это во многом обусловлено тем, что усиление или ослабление активности реакций в указанном звене метаболизма способно существенно снизить резистентность организма к воздействию на него неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды, а также создать предпосылки к ускоренному развитию и усугублению тяжести течения различных патологических процессов. Характерной особенностью реакций ПОЛ является их высокая степень мембранной специфичности, в связи с чем этот процесс часто определяют как мембранную патологию.

Нарушение деятельности систем, контролирующих протекание окислительных свободнорадикальных реакций, в том числе мембранных структур клеток, приводит к резкому накоплению токсических перекисей. Следствием этого являются глубокие перестройки метаболизма клетки и в конечном итоге ее деградация и гибель (Ю П Козлов, 1975).

Представления о том, что свободно-радикальное окисление (СРО) – один из фундаментальных биологических процессов, обеспечивающих нормальную жизнедеятельность организма (Арчаков А И, 1983, Бурлакова Е Б, 1992, Фархутдинов Р Р, Лиховских В А, 1995, Владимир Ю А, 1998), что свободные радикалы участвуют в обмене веществ, обеспечивают защитные реакции, разрушение чужеродных соединений, как поступающих извне, так и образующихся в организме (Арчаков А И, Мохосоев И М, 1989, Кожевников Ю Н, 1995, Владимир Ю А, 1998) оказываются неоспоримыми до настоящего времени. А также и о том, что действие многих неблагоприятных факторов – облучение, введение в организм некоторых лекарственных препаратов, стрессы, физическое перенапряжение изменяет скорость СРО и количество свободных радикалов в живой системе (Барабой В А, 1992, Фархутдинов Р Р, 2002, Lewin G, 1994), что образующиеся в избыточном количестве свободные радикалы непосредственно взаимодействуют с органическими соединениями, вследствие чего теряется биологическая активность белков, ферментов, нуклеиновых кислот и т.д. (Дюмаев, 1995), и кроме того продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) токсичны, ингибируют пролиферацию и созревание клеток, обладают канцерогенными свойствами (Барабой В А, 1991, Воскресенский, 1992, Сторожок и др, 1995; Шепелев А П и др, 2000).

Цель исследований. Цель настоящего исследования – экспериментально определить терапевтическую эффективность эмицидина при лечении лошадей с хроническими заболеваниями легких.

Задачи исследований. В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи

1 Провести анализ морфофункциональных, биохимических и

14

антиоксидантных показателей крови у клинически здоровых лошадей

2 Отработать методики определения супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы, глутатионредуктазы и восстановленного глутатиона на биохимическом анализаторе Спта МС-15 для контроля антиоксидантного статуса крови здоровых и больных лошадей

3 Выявить зависимость антиоксидантных показателей от возраста, пола и клинического состояния лошадей

4 Установить клиническую симптоматику лошадей с хроническими заболеваниями легких до и после комплексного лечения

5 Определить динамику морфофункциональных, биохимических и антиоксидантных показателей крови у лошадей с хронической эмфиземой легких до и после внутривладельственного и комплексного лечения

6 Разработать схему лечебных мероприятий при хронической эмфиземе легких у лошадей с использованием эмицидина

Научная новизна. Впервые для лечения лошадей с хронической эмфиземой легких использовали эмицидин с определением антиоксидантного статуса крови у здоровых и больных лошадей до и после внутривладельственного и комплексного лечения по следующим показателям: активность супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы, каталазы, глутатионредуктазы и концентрация восстановленного глутатиона в крови, а также отработаны методики для их определения на биохимическом анализаторе Спта МС-15, позволившие разработать современные и объективные критерии оценки антиоксидантного статуса крови

Разработана схема лечебно-профилактических мероприятий хронической эмфиземы легких у больных лошадей с использованием эмицидина

Установлена терапевтическая эффективность эмицидина при лечении лошадей с хронической эмфиземой легких, подтвержденная морфофункциональными, биохимическими исследованиями и определением антиоксидантных показателей крови

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана концептуальная база об антиоксидантном статусе, как комплексном системном показателе эффективности функционирования антиоксидантной защиты. Усовершенствованы и апробированы методы лабораторной диагностики, которые явились базой лечебно-профилактических мероприятий при хронических заболеваниях легких. Выявленные изменения биохимических и антиоксидантных показателей крови при хронической эмфиземе легких являются теоретической предпосылкой прогнозирования тяжести течения и исхода данного заболевания лошадей в комплексе с клиническими признаками и анамнезом.

Разработан и внедрен в практику метод диагностики эмфиземы легких, основанный на комплексном анализе морфофункциональных и биохимических показателей, а также антиоксидантного статуса крови и клинического состояния больных лошадей

Установлен положительный терапевтический эффект воздействия эмицидина при хроническом течении эмфиземы легких у лошадей

Разработана схема лечебно-профилактических мероприятий хронической эмфиземы легких у лошадей с использованием эмицидина

Апробация и реализация результатов исследований. Результаты научных и производственных экспериментов были доложены на седьмой научно-практической конференции по болезням лошадей 16-19 августа 2006 г, на методической и научной конференции преподавателей, сотрудников и аспирантов ФГОУ ВПО МГАВМиБ (Москва 2006), используются в учебном процессе на кафедре внутренних незаразных болезней животных ФГОУ ВПО МГАВМиБ при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий (в частности методические указания по курсу «Ветеринарная лабораторная диагностика» на тему «Методики определения показателей системы антиоксидантной защиты организма на биохимическом анализаторе Спта МС-15» для студентов факультетов ветеринарной медицины, биотехнологии и ветеринарных врачей)

Публикации результатов исследований. По материалам собственных исследований опубликованы 3 научные работы, в которых отражено основное содержание диссертации, из них 2 в журнале «Ветеринарная патология» №2 (21), №2 (25) и 1 в Материалах седьмой научно-практической конференции по болезням лошадей 2006г

Основные положения, выносимые на защиту:

1 Этиологические факторы, обуславливающие развитие хронической эмфиземы легких у лошадей

2 Клиническая характеристика хронического течения эмфиземы легких у лошадей

3 Морфофункциональные, биохимические и антиоксидантные показатели крови клинически здоровых и больных лошадей

4 Терапевтическая эффективность эмицидина в составе комплексной терапии лошадей с хроническими заболеваниями легких

5 Схема лечебно-профилактических мероприятий при хронической эмфиземе легких у лошадей с использованием эмицидина в качестве комплексного антиоксидантного и антигипоксикантного препарата

2. Собственные исследования

В данной работе было обследовано 41 животное в возрасте от 2 до 15 лет, тракненской и орловской пород, обоего пола (32 здоровых, 9 клинически больных лошадей, из которых 6 лечили комплексным методом (опытная группа) и 3 внутрихозяйственным методом (контрольная группа). Комплексное лечение включало в себя внутрихозяйственное (симптоматическое) лечение с дополнительным применением эмицидина, каждую из этих групп обследовали до и после лечения Курс эмицидина в комплексном лечении составлял 10 дней Животных для исследований предоставили 1-ый Московский конный завод, КСК «Батыр», КСК «Матадор» и владельцы частных конферм

2.1. Материал и методы исследований

2.1.1. Методы морфофункциональных и биохимических исследований

Анализы выполняли в ветеринарной лаборатории «Шанс Био» Морфофункциональный анализ крови выполняли на ветеринарном гематологическом анализаторе Abacus junior vet, СОЭ измеряли капиллярами Панченкова в СОЭ-метре, лейкограмму подсчитывали на микроскопе Motic BA 300 с помощью гематологического лабораторного счетчика С-5 Стимул Плюс, через иммерсионный объектив ($\times 100$) по зигзагу (по линии «Меандра») Окраску мазков производили в красителе «гемокрафикс» 5 минут и затем в фосфатном буфере 10 минут Подсчитывали только целые (неразрушенные) лейкоциты Биохимический анализ крови выполняли на биохимическом анализаторе CLIMA MC – 15, с использованием реактивов и методик, входящих в стандартную комплектацию оборудования по прилагающимся к нему инструкциям

2.1.2. Методы определения антиоксидантной активности в крови животных:

Определение активности супероксиддисмутазы в эритроцитах

За основу взята методика определения активности супероксиддисмутазы (КФ 1 15 1 1) в эритроцитах (Архипов А.В., 2004)

П р и н ц и п Метод основан на торможении супероксиддисмутазой (СОД) восстановления бесцветных тетразолиевых солей супероксидными анионрадикалами, при котором происходит их превращение в окрашенные соединения (формазаны)

Р е а к т и в ы 0,2 ммоль/л раствор ЭДТА-Na 37 г ЭДТА-Na (трилон Б) растворяют в 500 мл дистиллированной воды,

0,05 моль/л раствор тетраметиленамина (ТЭМЭД) 0,28 мл ТЭМЭД растворяют в 40 мл 0,2 ммоль/л раствора ЭДТА-Na Реактив годен для использования через 2 ч после приготовления в течение 1 сут,

0,034 ммоль/л раствор рибофлавина 1,3 мг рибофлавина растворяют при перемешивании на магнитной мешалке в течение 20—30 мин в 100 мл дистиллированной воды Раствор хранят в склянке из темного стекла Годен в течение рабочего дня,

0,85 ммоль/л раствор пара-нитротетразолия хлористого (п-НТХ) 32 мг п-НТХ растворяют в 100 мл дистиллированной воды Реактив растворяется медленно, поэтому следует это делать на магнитной мешалке с подогревом до 50° С Хранят в склянке из темного стекла в течение 1 мес,

0,1 моль/л фосфатный буфер, рН 7,8 1,3616 г K_2HPO_4 растворяют в 100 мл воды, 16,036 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 900 мл воды К одной части раствора калия фосфата добавляют 9 частей раствора натрия фосфата и рН определяют в помощью преобразователя ионометрического И-500,

0,1 моль/л буфер, рН 9,85 для этого половину буферного раствора с рН 7,8 оставляют, а другую половину с помощью концентрированного раствора КОН доводят до рН 9,85; 1%-ный раствор калия йодида, 0,9%-ный раствор натрия хлорида, хлороформ-этаноловая смесь (ХЭС) в соотношении 5 3 (об/об)

Оборудование биохимический анализатор Clima MC-15, лампа дневного света мощностью 40 Вт, длина трубки 1 м и более, штатив для пробирок на 20—30 гнезд в один ряд, закрытый спереди и сзади черной бумагой, весы аналитические, магнитная мешалка, секундомер, центрифуга рефрижераторная, холодильник бытовой, баня водяная, колбы мерные, пипетки с делениями разные, микродозаторы, пробирки химические и центрифужные

Ход определения Для исследования берут эритроциты, отмытые трижды холодным 0,9%-ным раствором натрия хлорида из 0,5 мл гепаринизированной крови, добавляют 5 мл охлажденной до 1—4 °С дистиллированной воды и ставят в ледяную баню на 15 мин для полного гемолиза. Затем 1,5 мл гемолизата переносят в центрифужные пробирки (можно использовать одноразовые пластиковые биохимические проирки), прибавляют по 0,5 мл ХЭС, перемешивают и оставляют стоять на 10—15 мин в ледяной бане. После этого пробирки центрифугируют при 0—4°C и 3000 мин⁻¹ в течение 15 мин. Надосадочную жидкость (бесцветную или слегка желтую) разбавляют дистиллированной водой в 20 раз. Половину полученного раствора (биологического материала) оставляют в химических пробирках в ледяной бане, другую половину помещают в кипящую водяную баню на 10 мин (вода должна постоянно кипеть) для инактивации фермента. Для каждой пробы берут по три химических пробирки, ставят в закрытый штатив и добавляют в них растворы реактивов и биологический материал (табл №1)

Таблица №1

Порядок приготовления растворов для определения активности КФ
1.15.1.1

№ ⁰ п/п	Реактив	Опыт, мл	Контроль ,мл	Контроль на реактив,мл
1	0,1 моль/л фосфатный буфер, рН 7,8	1,0	1,0	-
2	0,1 моль/л фосфатный буфер, рН 9,85	-	-	2,0
3	0,05 моль/л ТЭМЭД	1,0	1,0	-
4	0,85 моль/л п-нитратетразоля	1,0	1,0	1,0
5	Вода дистиллированная	5,0	5,0	5,0
6	Биологический материал (БМ)	0,2	-	-

7.	БМ после кипячения	-	0,2	0,2
8	0,034 ммоль/л раствор рибофлавина	2,0	2,0	2,0

Содержимое пробирок старательно перемешивают и штатив с ними устанавливают на расстоянии 20 см от лампы дневного света. Включают лампу, прогревают ее в течение 10 мин. Открывают переднюю стенку штатива, облучают пробы в течение 5 мин (по секундомеру) и закрывают переднюю стенку штатива.

Во все пробирки добавляют как можно быстрее по 1 мл 1%-ного раствора калия йодида (для остановки реакции) и сразу интенсивно перемешивают. Наливают микродозатором 0,5 мл пробы в большой отсек ячейки (для реагентов) в кювету биохимического анализатора. Измеряют оптическую плотность каждой пробы при 540 нм в кюветах с ходом луча 10 мм против дистиллированной воды на биохимическом анализаторе Спма МС-15. Количество гемоглобина в крови определялось на гематологическом анализаторе abacus junior vet.

Процент торможения СОД образования фармазана п-НТХ определяют по формуле

$$T = \frac{E_k - E_{оп}}{E_k - E_{кр}} \times 100$$

T — процент торможения реакции, E_k — оптическая плотность контрольной пробы, $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы, $E_{кр}$ — оптическая плотность пробы контроля на реактивы, 100 — коэффициент для перевода в проценты.

Принято считать, что 50 % ингибирования реакции соответствует одной относительной единице (1 отн. ед.) активности фермента. Количество отн. ед. активности фермента, внесенного в пробу, рассчитывают по формуле

$$M = 10^{(0,026 \times T - 1,3)}$$

M — количество отн. ед. активности в пробе, T — процент торможения реакции.

Активность СОД в пересчете на содержание гемоглобина рассчитывают по формуле

$$A = \frac{ME_{ст}}{0,1236 E_{гем}}$$

A — активность фермента (СОД), ед. акт/мг гемоглобина, M — количество единиц фермента в пробе, $E_{ст}$ — оптическая плотность стандартного раствора, содержащего 59,75 мг гемоглобинцианида в 100 мл, $E_{гем}$ — оптическая плотность опытной пробы гемолизата при определении гемоглобина.

Примечания 1 Пробы гепаринизированной крови можно хранить при 4 °С не более 1 сут. 2 Химические пробирки, в которых ведется определение активности фермента, должны быть одинаковыми по диаметру,

толщине стенок и цвету стекла 3 В добавке биологического материала должна содержаться примерно 1 ед активности фермента (степень торможения должна составлять 35—55 %)

Определение активности каталазы в крови

За основу взята методика определения активности каталазы (КФ 1 11 1 6) в крови (Архипов А В , 2004)

П р и н ц и п Метод основан на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм

Р е а к т и в ы 0,04412 н раствор пероксида водорода Готовят примерно 0,08%-ный раствор H_2O_2 и устанавливают точную концентрацию титрованием 0,01 н раствором $KMnO_4$ На титрование 5 мл 0,044 12 н раствора H_2O_2 должно пойти 22,06 мл 0,01 н раствора $KMnO_4$ По результатам титрования раствор H_2O_2 доводят до нужной концентрации дистиллированной водой,

4 5%-ный раствор аммония молибденовокислого 4,5 г молибдата аммония растворяют в 95,5 мл дистиллированной воды,

0,1 моль/л трис-НСI-буфер, рН 7,4,

буферно-субстратная смесь 10 мл трис-НСI-буфера смешивают с 30 мл 0,04412 н раствора H_2O_2

О б о р у д о в а н и е биохимический анализатор Спта МС-15, баня водяная, весы аналитические, микродозаторы, секундомер, бюретки, пипетки с делениями, пробирки биохимические пластиковые одноразовые, пробирки химические стеклянные

Х о д о п р е д е л е н и я К 0,5 мл гепаринизированной крови приливают 3,5 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 5—10 мин при комнатной температуре — основной гемолизат К 0,2 мл основного гемолизата прибавляют 3,8 мл воды и тщательно перемешивают — рабочий гемолизат В первую ячейку кюветы биохимического анализатора в большой отсек (для реагентов) наливают 0,125 мл буфера и 0,375 мл дистиллированной воды, в малый отсек (для проб) — 0,0125 мл рабочего гемолизата — это раствор сравнения Во вторую (контрольную) ячейку кюветы наливают 0,25 мл буферно-субстратной смеси и в третью (опытную) — 0,25 мл буферно-субстратной смеси Инкубируют в термостате в течение 10 мин при 37°С Затем в опытную ячейку в малый отсек добавляют 0,0125 мл рабочего гемолизата, перемешивают и инкубируют в течение 3 мин по секундомеру при 37°С Реакцию останавливают добавлением в опытную пробу сначала 0,25 мл молибдата аммония, а затем 0,125 мл рабочего гемолизата Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб при 405 нм в кювете с ходом луча 10 мм Активность каталазы рассчитывают по формуле

$$A = \frac{(E_k - E_{оп}) \times 4,1 \times 16 \times 10^5 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3}$$

где А — активность фермента, МЕ (мкмоль пероксида водорода/л·мин), E_k — оптическая плотность контрольной пробы; $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы, 4,1 — конечный объем пробы, 16×10^5 фактор разведения, 10^6 — коэффициент пересчета в мкмоль/л, $22,2 \times 10^6$ — коэффициент малярной экстинкции H_2O_2 , 3 — время инкубации, мин

П р и м е ч а н и е Пробы гепаринизированной крови можно хранить при 4°C в течение 1 сут

Определение активности пероксидазы в крови

За основу взята методика определени активности пероксидазы (КФ 11117) в крови (Архипов А В , 2004)

П р и н ц и п Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина пероксидом водорода при участии фермента образованием окрашенного продукта реакции, имеющего максимум поглощения при 520 нм

Р е а к т и в ы 2,5 ммоль/л раствор бензидина 184,2 мг бензидина растворяют при нагревании в смеси из 100 мл дистиллированной воды и 2,3 мл ледяной уксусной кислоты После полного растворения бензидина раствор охлаждают и растворяют в нем 5,45 г трехводного натрия ацетата После этого общий объем раствора доводят дистиллированной водой до 400 мл,

0,333 н раствор пероксида водорода сначала готовят 0,6%-ный раствор его и концентрацию пероксида определяют титрованием 0,1 н раствором перманганата калия На титрование 3 мл 0,333 н раствора H_2O_2 должно пойти 10 мл 0,1 н $KMnO_4$ По результатам титрования раствор H_2O_2 доводят до нужной концентрации дистиллированной водой

О б о р у д о в а н и е биохимический анализатор Сlma MC-15, весы аналитические, секундомер, бюретки для титрования, пробирки химические, пробирки пластиковые одноразовые, микродозаторы

Х о д о п р е д е л е н и я. К 0,1 мл основного гемолизата гепаринизированной крови (приготовленный, как описано выше при определении активности каталазы) прибавляют 19,9 мл дистиллированной воды — рабочий гемолизат В первую ячейку кюветы биохимического анализатора в большой отсек приливают 0,4 мл раствора бензидина и 0,1 мл раствора пероксида водорода 0,333н — это раствор сравнения Во вторую ячейку кюветы в большой отсек приливают 0,4 мл раствора бензидина и 0,1 мл раствора пероксида водорода 0,333н, в малый отсек — 0,020 мл

дистиллированной воды – контрольная ячейка для учета изменения оптической плотности за счет неферментативного окисления бензидина В третью (опытную) ячейку кюветы наливают 0,4 мл раствора бензидина и 0,1 мл раствора пероксида водорода 0,333н – в большой отсек, 0,020 мл рабочего гемолизата и 0,005 мл 1М NaNO₃ Кювету инкубируют в течение 3 минут при 37⁰С, перемешивают и ровно через 1 минуту (по секундомеру) снимают показания оптической плотности при длине волны 500 нм
Р а с ч е т активности пероксидазы крови проводят по формуле

$$A = \frac{(E_0 - E_k) \times 16,08 \times 10^6}{60}$$

60

где А — активность фермента, ед опт пл/л×с, E₀ — оптическая плотность опытной пробы, E_к— оптическая плотность контрольной пробы, 16,08×10⁶ — фактор разведения 60 — время проведения реакции, с

П р и м е ч а н и я 1 Пробы гепаринизированной крови можно хранить при 4⁰С в течение 1 сут 2 Добавлять NaNO₃ в рабочий гемолизат необходимо в малый отсек с последующим перемешиванием (в малом же отсеке)

Определение активности глутатионредуктазы в крови

За основу взята методика определения активности глутатионредуктазы (КФ 1 6 4 2) в крови (Архипов А В , 2004)

П р и н ц и п Глутатионредуктаза (ГР), используя восстановленные формы пиридиннуклеотидов, переводит окисленную форму глутатиона в восстановленную По степени увеличения количества восстановленного глутатиона в среде инкубации рассчитывают активность фермента

Р е а к т и в ы 0,1 моль/л фосфатный буфер, рН 7,4 6,8 г КН₂Р₀₄ растворяют в 500 мл дистиллированной воды, 11,4 г К₂НР₀₄× 3Н₂0 — в 500 мл воды и смешивают полученные растворы под контролем рН-метра до получения необходимого рН,

4,0 ммоль/л раствор окисленного глутатиона 134,75 мг окисленного глутатиона и 0,5 мг ЭДТА-Na растворяют в 55 мл фосфатного буфера, рН 7,6 Раствор готовят в день исследований,

5,35 ммоль/л раствор НАДФ × Н₂ 11,16 мг НАДФ × Н₂ растворяют в 2,5 мл дистиллированной воды Раствор готовят перед использованием,

10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты 10 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды,

0,3 моль/л раствор фосфатного буфера, рН 8,0 10,2 г КН₂Р₀₄ растворяют в 250 мл дистиллированной воды, 34,2 г К₂НР₀₄ × 3Н₂ 0 — в 500

мл воды и смешивают полученные растворы под контролем рН-метра до получения необходимого рН,

10,0 ммоль/л раствор реактива Элмана 39,6 мг 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта

Оборудование биохимический анализатор, центрифуга, баня водяная, холодильник бытовой, весы аналитические, рН-метр (использовался иономер И-500), секундомер, пипетки измерительные, микродозаторы, пробирки химические и центрифужные, колбы мерные, пробирки химические пластиковые одноразовые

Ход определения В химические пробирки наливают по 0,5 мл крови и добавляют по 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и ставят в холодильник на 10—15 мин для полного гемолиза. В химические пробирки вносят по 1 мл раствора окисленного глутатиона, прибавляют по 0,5 мл основного гемолизата крови и хорошо перемешивают. По 0,5 мл полученной смеси переносят в две центрифужные пробирки, помещают их в термостат при 37° С и инкубируют в течение 7 мин. В опытную пробирку (можно использовать пробирки эппендорфа) добавляют 0,05 мл раствора НАДФ · Н₂, интенсивно встряхивают и оставляют в термостате. Ровно через 10 мин (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 0,5 мл холодного 10%-ного раствора ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,05 мл раствора НАДФ · Н₂. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 мин в холодильник. Пробы центрифугируют в течение 15 мин при 3000 мин⁻¹ и 0-4°С. В первую ячейку кюветы ничего не наливают. Во вторую ячейку кюветы (контрольную) в большой отсек наливают 0,1 мл надосадочной жидкости из контрольной пробирки и 0,5 мл фосфатного буфера рН 8,0, в малый отсек добавляют 0,005 мл реактива Элмана. В третью ячейку кюветы (опытную) в большой отсек добавляют 0,1 мл надосадочной жидкости из опытной пробирки и 0,5 мл фосфатного буфера рН 8,0, в малый отсек приливают 0,005 мл реактива Элмана. Перемешивают и измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 405 нм.

Расчет активности глутатионредуктазы производят по формуле

$$A = \frac{E \times 6,05 \times 10^6 \times 84}{13100 \times 10 \times 2}$$

где А — активность фермента, ммоль окисленного глутатиона/л × 5 мин, Е — оптическая плотность, 6,05 — конечный объем пробы, 10⁶ — коэффициент пересчета в ммоль/л, 84 — фактор разведения крови, 13 100 — коэффициент малярности экстинкции ТНФА, 10 — время инкубации, мин, 2 — коэффициент пересчета на окисленный глутатион

Определение концентрации восстановленного глутатиона в крови

За основу взята методика определения концентрации восстановленного глутатиона в крови (Архипов А В , 2004)

П р и н ц и п Сульфгидрильная группа восстановленного глутатиона вступает в реакцию с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Эллмана), в результате чего в эквимольных количествах образуется окрашенный в желтый цвет тионитрофенильный анион (ТНФА), имеющий максимум поглощения при 405 нм

Р е а к т и в ы 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ),

0,3 моль/л фосфатный буфер, рН 8,0 10,2 г K_2HPO_4 растворяют в 250 мл дистиллированной воды и 34,2 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ — в 500 мл дистиллированной воды В раствор двузамещенного фосфорнокислого калия под контролем рН-метра приливают раствор однозамещенного фосфорнокислого калия до установления рН 8,0,

10,0 моль/л раствор реактива Эллмана 39,6 мг 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта

О б о р у д о в а н и е биохимический анализатор Спма МС-15 , центрифуга, весы аналитические, холодильник бытовой, пипетки измерительные, микродозаторы, пробирки центрифужные и химические, стеклянные и одноразовые пластиковые

Х о д о п р е д е л е н и я В химические пробирки наливают по 0,5 мл гепаринизированной крови, 3,5 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают для лучшего гемолиза Затем по 0,5 мл разведенной в 8 раз крови переносят в центрифужные пробирки и приливают к ним по 0,25 мл 20%-ного раствора ТХУ Пробы тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 15—20 мин Затем их центрифугируют 15 мин при 3000 мин^{-1} и температуре 0—4 °С

В первую ячейку (оптический ноль) в большой отсек наливают по 0,5 мл фосфатного буфера рН 8,0 Во вторую ячейку (контрольную) в большой отсек наливают 0,15 мл фосфатного буфера рН 8,0 и 0,3 мл надосадочной жидкости, в малый отсек наливают 0,015 мл метанола В третью ячейку (опытную) в большой отсек наливают 0,15 мл фосфатного буфера и 0,3 мл надосадочной жидкости, в малый отсек — 0,015 мл реактива Эллмана Перемешивают и измеряют оптическую плотность обеих проб против фосфатного буфера в 10-миллиметровой кювете при длине волны 405 нм Концентрацию восстановленного глутатиона рассчитывают по формуле

$$C = \frac{E_0 - E_k}{13,1 \times 10^3} \times 72,6 \times 10^3,$$

где С — содержание восстановленного глутатиона, ммоль/л, E_0 — оптическая плотность опытной пробы, E_k — оптическая плотность контрольной пробы, $13,1 \times 10^3$ -малярной экстинкции ТНФА при 412 нм, $72,6 \times 10^3$ — фактор разведения

П р и м е ч а н и я 1 Исследование крови необходимо проводить в максимально короткие сроки после ее взятия 2 Реактив Элмана следует приливать к буферу как можно быстрее после внесения в него надосадочной жидкости, для этого нужно соблюдать следующую последовательность сначала в большой отсек и контрольной и опытной ячеек наливают фосфатный буфер, затем в малый отсек вносят реактив Элмана и метанол соответственно, ставят кювету в устройство для перемешивания на биохимическом анализаторе добавляют в буфер надосадочную жидкость, нажимают кнопку [MIX] и переставляют считать

3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Морфологическая характеристика крови в норме у клинически здоровых лошадей

Проведенные исследования общего анализа крови клинически здоровых лошадей соответствуют референтным интервалам ветеринарной лаборатории Шанс Био и отражены в таблице с расчетом среднего арифметического значения и среднего квадратического отклонения

Таблица 2

Морфофункциональные показатели крови у клинически здоровых лошадей:

Показатели	Значение
Гематокрит, Ht	36,7 ($\pm 1,22$)
Гемоглобин, Hb	126,6 ($\pm 3,37$)
Эритроциты, RBC	7,41 ($\pm 0,19$)
СОЭ, ESR	26,35 ($\pm 0,96$)
Лейкоциты, WBC	7,48 ($\pm 0,24$)
Палочкоядерные нейтрофилы	0,8 ($\pm 0,28$)
Сегментоядерные нейтрофилы	56,85 ($\pm 1,38$)
Эозинофилы, EOS	2,8 ($\pm 0,52$)
Моноциты, MONO	4,2 ($\pm 0,38$)
Базофилы, BAS	0 (0)
Лимфоциты, LYM	35,3 ($\pm 1,36$)

3.2. Морфофункциональная характеристика крови при хронической эмфиземе легких у лошадей до, и после получения курса эмицидина

Проведенные исследования общего анализа крови у клинически больных лошадей отражены в следующей таблице с расчетом среднего арифметического значения, среднего квадратического отклонения и уровня достоверности для уровня вероятности $P=99$

Таблица 3

Морфофункциональные показатели крови лошадей больных эмфиземой легких:

Показатели	Значения до получения курса эмицидина	Значения после получения курса эмицидина	Уровень достоверности для уровня вероятности $P=99$
Гематокрит, Ht	39,9 ($\pm 2,56$)	41,43 ($\pm 0,41$)	$\pm 0,352$
Гемоглобин, Hb	129,8 ($\pm 8,46$)	140,3 ($\pm 1,76$)	$\pm 0,252$
Эритроциты, RBC	7,72 ($\pm 0,47$)	8,07 ($\pm 0,15$)	$\pm 0,495$
СОЭ, ESR	28,3 ($\pm 1,05$)	30 ($\pm 0,57$)	$\pm 0,196$
Лейкоциты, WBC	7,58 ($\pm 0,56$)	7,21 ($\pm 0,29$)	$\pm 0,573$
Палочкоядерные нейтрофилы	0,167 ($\pm 0,167$)	0,167 ($\pm 0,167$)	± 1
Сегментоядерные нейтрофилы	51,67 ($\pm 3,94$)	60,67 ($\pm 1,8$)	$\pm 0,064$
Эозинофилы, EOS	1 ($\pm 0,447$)	0,66 ($\pm 0,33$)	$\pm 0,563$
Моноциты, MONO	16,33 ($\pm 2,94$)	5,66 ($\pm 0,42$)	$\pm 0,005$
Базофилы, BAS	0 (0)	0 (0)	± 0
Лимфоциты, LYM	30,83 ($\pm 4,44$)	32,83 ($\pm 1,37$)	$\pm 0,676$

Из данной таблицы видно что достоверно изменяется только количество моноцитов в лейкограмме – это говорит о том, что после получения курса эмицидина падает интенсивность воспалительного процесса и лейкограмма начинает соответствовать клиническому анализу здорового животного. Остальные показатели достоверно не изменяются, но аналогичны таковым у клинически здоровых лошадей

3.3. Биохимические показатели крови у клинически здоровых лошадей

При проведении данных исследований выяснено, что биохимические показатели клинически здоровых лошадей достоверно не различаются (те показатели идентичные и входят в референтные интервалы лаборатории Шанс Био, а также указанные в различной учебной литературе), поэтому в нижеследующей таблице эти группы животных рассматриваются как одна группа

Таблица 4

Биохимические показатели крови у клинически здоровых лошадей:

Показатели	Значение
Билирубин общий	14,2 ($\pm 0,83$)
Билирубин прямой	4,48 ($\pm 0,44$)
АСТ	287,2 ($\pm 10,51$)
АЛТ	14,2 ($\pm 1,46$)
Мочевина	6,32 ($\pm 0,29$)
Креатинин	144,5 ($\pm 2,83$)
Общий белок	72,1 ($\pm 0,73$)
Альбумин	32,2 ($\pm 1,015$)
Щелочная фосфатаза	331,8 ($\pm 22,14$)
Амилаза	10,04 ($\pm 1,04$)
Глюкоза	6,53 ($\pm 0,16$)
ЛДГ	326,3 ($\pm 26,27$)
ГГТ	19,05 ($\pm 1,42$)
Холестерин	3,01 ($\pm 0,12$)
Триглицериды	0,33 ($\pm 0,03$)
КФК	125,4 ($\pm 15,4$)
Фосфор	1,34 ($\pm 0,07$)
Кальций	3,4 ($\pm 0,07$)
Магний	0,8 ($\pm 0,01$)
Железо	45 ($\pm 1,85$)

Затем для сравнения было проведено биохимическое исследование крови лошадей, больных хронической эмфиземой легких до получения курса эмицидина и после получения курса эмицидина, что выявило зависимость изменения некоторых биохимических показателей от изменения антиоксидантной активности крови

3.4. Биохимические показатели крови при хронической эмфиземе легких у лошадей до и после получения курса эмицидина

Таблица №5

Биохимические показатели крови клинически больных лошадей до и после получения курса эмицидина:

Показатели	Значение до получения курса эмицидина	Значение после получения курса эмицидина	Уровень достоверности для урона вероятности P=99
Билирубин общий	17,15 ($\pm 0,57$)	14,72 ($\pm 2,26$)	$\geq 0,322$
Билирубин прямой	2,88 ($\pm 0,22$)	4,13 ($\pm 0,84$)	$\geq 0,184$
АСТ	330,8 ($\pm 42,8$)	321,3 ($\pm 39,3$)	$\geq 0,873$
АЛТ	9,33 ($\pm 2,7$)	13,17 ($\pm 1,72$)	$\geq 0,258$
Мочевина	8,27 ($\pm 1,63$)	6,15 ($\pm 0,33$)	$\geq 0,233$
Креатинин	157,2 ($\pm 12,8$)	153,8 ($\pm 20,67$)	$\geq 0,894$
Общий белок	74,33 ($\pm 2,59$)	80,17 ($\pm 1,78$)	$\geq 0,093$
Альбумин	37,33 ($\pm 1,38$)	41,83 ($\pm 0,47$)	$\geq 0,012$
Щелочная фосфатаза	436,3 ($\pm 63,3$)	467,3 ($\pm 57,4$)	$\geq 0,724$
Амилаза	9,83 ($\pm 5,47$)	10 ($\pm 4,82$)	$\geq 0,982$
Глюкоза	6,93 ($\pm 0,72$)	7,42 ($\pm 0,16$)	$\geq 0,529$
ЛДГ	289,7 ($\pm 19,78$)	342 ($\pm 34,28$)	$\geq 0,215$
ГГТ	50,83 ($\pm 28,11$)	51,5 ($\pm 22,51$)	$\geq 0,986$
Холестерин	3,28 ($\pm 0,34$)	3,56 ($\pm 0,25$)	$\geq 0,517$
Триглицериды	0,583 ($\pm 0,155$)	0,298 ($\pm 0,048$)	$\geq 0,112$
КФК	86,17 ($\pm 17,75$)	144 ($\pm 19,64$)	$\geq 0,054$
Фосфор	0,815 ($\pm 0,15$)	1,04 ($\pm 0,049$)	$\geq 0,191$
Кальций	3,62 ($\pm 0,22$)	3,2 ($\pm 0,23$)	$\geq 0,220$
Магний	1,15 ($\pm 0,076$)	0,57 ($\pm 0,101$)	$\geq 0,001$
Железо	55,05 ($\pm 6,69$)	75,72 ($\pm 8,27$)	$\geq 0,081$

Из таблицы 5 следует, что биохимические показатели крови клинически больных эмфиземой легких лошадей после получения курса эмицидина достоверно не изменяются, однако видны тенденции приближения среднего арифметического значения некоторых показателей к среднему арифметическому значению таковых у клинически здоровых лошадей, например билирубин общий, билирубин прямой, АСТ, АЛТ, мочевина, креатинин, амилаза, триглицериды, креатинфосфокиназа, фосфор, кальций, магний. Это свидетельствует о том, что происходит восстановление функций всех основных органов и систем. В подтверждение этому у лошадей купировались клинические признаки заболевания, повысилась активность и аппетит.

3.5. Показатели антиоксидантной активности крови у клинически здоровых лошадей

Показатели антиоксидантной активности крови в норме у клинически здоровых средневозрастных и старых лошадей не различаются, поэтому для этих возрастов по всем показателям рассчитали одно среднее арифметическое значение и среднее квадратическое отклонение

Таблица 6

Показатели антиоксидантной активности крови клинически здоровых лошадей:

Показатели	Значение
СОД, ед акт/мг гемоглобина	1,251 ($\pm 0,091$)
Каталаза, мкмоль пероксида водорода/ л \times мин $\times 10^3$	40,25 ($\pm 3,71$)
Пероксидаза, ед опт пл/л \times с	7,077 ($\pm 0,423$)
Глутатион- редуктаза, ммоль окисленного глутатиона/л $\times 5$ мин	315,3 ($\pm 7,59$)
Глутатион восстановленный, моль/л	1,16 ($\pm 0,083$)

По данным Архипова А В показатели активности СОД у здоровых взрослых животных колеблется от 1,0 до 7,5 ед акт/мг гемоглобина. Активность каталазы в норме в крови животных колеблется от 20 до 60 мкмоль H_2O_2 /л \times мин $\times 10^3$, пероксидазы – от 30 до 65 ед опт пл/л с. Активность ГР в крови животных колеблется от 150 до 450 мкмоль окисленного глутатиона/л мин. Содержание восстановленного глутатиона в крови животных колеблется от 0,4 до 0,7 ммоль/л (Архипов, А В 2004).

После определения показателей, указанных в данной таблице 6, было установлено, что показатели антиоксидантной активности крови в норме у

клинически здоровых средневозрастных и старых лошадей обоего пола не различаются, исходя из чего по этим показателям рассчитали среднее арифметическое значение и среднее квадратическое отклонение для этой группы животных. Затем было проведено исследование антиоксидантной активности крови лошадей до и после комплексного лечения.

3.6. Показатели антиоксидантной активности крови при хронической эмфиземе легких у лошадей до и после комплексного лечения

Таблица 7

Показатели антиоксидантной активности крови при хронической эмфиземе легких у лошадей до и после комплексного лечения

Показатели	Значения до получения курса эмицидина	Значения после получения курса эмицидина	Уровень достоверности для уровня вероятности P=99
СОД, ед акт/мг гемоглобина	3,067 ($\pm 0,205$)	1,33 ($\pm 0,071$)	$\geq 0,0001$
Каталаза, мкмоль пероксида водорода/л \times мин $\times 10^3$	34,85 ($\pm 2,432$)	52,92 ($\pm 4,872$)	$\geq 0,008$
Пероксидаза, ед опт пл/л \times с	7,617 ($\pm 0,531$)	11,47 ($\pm 0,800$)	$\geq 0,002$
Глутатионредуктаза, мкмоль окисленного глутатиона/л $\times 5$ мин	217,2 ($\pm 12,71$)	308,3 ($\pm 12,89$)	$\geq 0,0001$
Глутатион восстановленный, моль/л	0,358 ($\pm 0,047$)	0,995 ($\pm 0,024$)	$\geq 0,0001$

Полученные результаты обработаны с помощью программы Biostatistic

Primer for Windows Компании McGraw-Hill

Как видно из данной таблицы, показатели антиоксидантной активности крови при хронической эмфиземе легких у лошадей изменяются следующим образом: активность фермента СОД повышается с $1,251(\pm 0,091)$ до $3,067(\pm 0,205)$ единиц активности/мг гемоглобина, активность фермента каталазы снижается с $40,25(\pm 3,71)$ до $34,85(\pm 2,432)$ мкмоль пероксида водорода/л \times мин $\times 10^3$, активность фермента пероксидазы повышается с $7,077(\pm 0,423)$ до $7,617(\pm 0,531)$ единиц оптической плотности/л \times с, активности глутатионредуктазы снижается с $315,3(\pm 7,59)$ до $217,2(\pm 12,71)$ ммоль окисленного глутатиона/л $\times 5$ минут, концентрация глутатиона восстановленного снижается с $1,16(\pm 0,083)$ до $0,358(\pm 0,047)$ моль/л

У лошадей клинически больных хронической эмфиземой легких после получения курса эмицидина следующие показатели антиоксидантной активности достоверно изменяются для уровня вероятности $P=99$: Активность фермента СОД снижается с $3,067(\pm 0,205)$ до $1,33(\pm 0,071)$, активность фермента каталазы повышается с $34,85(\pm 2,43)$ до $52,92(\pm 4,87)$ мкмоль пероксида водорода/л \times мин $\times 10^3$, активность фермента пероксидазы повышается с $7,617(\pm 0,531)$ до $11,47(\pm 0,80)$ единиц оптической плотности/л \times с, активность фермента глутатионредуктазы повышается с $217,2(\pm 12,71)$ до $308,3(\pm 12,89)$ моль окисленного глутатиона/л $\times 5$ минут, концентрация глутатиона восстановленного повышается с $0,358(\pm 0,047)$ до $0,995(\pm 0,024)$ моль/л

Как мы видим по полученным данным уровень активности СОД по сравнению с нормой после курса эмицидина приходит в норму, активность каталазы повышается в среднем на 18 единиц, активность пероксидазы повышается в среднем на 4 единицы, глутатионредуктазы – на 91 единицу, концентрация глутатиона восстановленного – на 0,6, что соответствует динамике восстановления антиоксидантного статуса организма в целом

3.7. Показатели антиоксидантной активности крови при хронической эмфиземе легких у лошадей после комплексного лечения и после внутривязального лечения

Таблица 8

Показатели антиоксидантной активности крови при хронической эмфиземе легких у лошадей после комплексного лечения и после внутривязального лечения

Показатели	Значения после комплексного лечения	Значения после внутривязального лечения	Уровень достоверности для уровня вероятности $P=99$
СОД, ед акт/мг гемоглобина	$1,33(\pm 0,07)$	$1,65(\pm 0,107)$	$\geq 0,039$

Каталаза, мкмоль пероксида водорода/л×мин×10 ³	52,92 (±4,872)	47,1 (±1,101)	≥0,445
Пероксидаза, ед опт пл/л×с	11,52 (±0,776)	8,29 (±0,531)	≥0,03
Глутатионредуктаза, ммоль окисленного глутатиона/л×5 мин	308,3 (±12,89)	264,7 (±5,162)	≥0,02
Глутатион восстановленный, ммоль/л	0,95 (±0,056)	0,567 (±0,032)	≥0,006

Таблица 8 показывает, что при комплексном лечении относительно внутрихозяйственного больше снижается активность фермента СОД – 1,33 (±0,07) против 1,65 (±0,107) ед акт/мг гемоглобина, интенсивнее повышается активность ферментов каталазы – 52,92 (±4,872) против 47,1 (±1,101) мкмоль пероксида водорода/л×мин×10³, пероксидазы – 11,52 (±0,776) против 8,29 (±0,531) ед опт пл/л×с, глутатионредуктазы – 308,3 (±12,89) против 264,7 (±5,162) ммоль окисленного глутатиона/л×5 мин и концентрацию глутатиона восстановленного – 0,95 (±0,056) против 0,567 (±0,032) ммоль/л. То есть при комплексном лечении относительно внутрихозяйственного больше снижается активность фермента СОД – на 0,32 ед акт/мг гемоглобина и больше повышается активность ферментов каталазы – на 5,82 мкмоль пероксида водорода/л×мин×10³, пероксидазы – на 3,23 ед опт пл/л×с, глутатионредуктазы – на 43,6 ммоль окисленного глутатиона/л×5 мин, концентрация глутатиона восстановленного – на 0,374 ммоль/л. Это говорит о том, что применение синтетических антиоксидантов позволяет восстановить антиоксидантную активность крови животного, при этом увеличив эффективность симптоматической терапии хронических заболеваний легких, а также доказывает терапевтическую эффективность препарата эмицидин в комплексе с внутрихозяйственным лечением.

Из полученных данных видно, что комплексное лечение значительно влияет на антиоксидантную активность крови животных по сравнению с внутрихозяйственным лечением, при этом наблюдается купирование проявления клинических признаков заболевания, улучшение аппетита, повышение подвижности животных, дыхание становится более глубокое, происходит усиление сердечных сокращений и снижается их количество.

Это показывает следующие выраженные действия эмицидина повышающее жизненные силы организма, усиливающее резистентность организма к различным микроорганизмам и устойчивость макроорганизма к вырабатываемым при этом продуктам ПОЛ, при возникновении комплекса – антиген-антитело, способствующее более быстрому восстановлению организма после заболевания, что отмечено ветеринарными специалистами и обслуживающим персоналом (установлен более короткий срок лечения при использовании эмицидина параллельно с классическим лечением эмфиземы легких на 3-4 дня, по сравнению со сроком классического лечения хронической эмфиземы легких у лошадей)

Таким образом классическое внутривоздушное лечение хронической эмфиземы легких у лошадей с использованием антиоксиданта, антигипоксанта – эмицидина, является новым наиболее эффективным методом лечения этого заболевания по сравнению с ранее предложенными, но не исключает их, а, наоборот, дополняет

Известно, что свободные радикалы в живой системе, образующиеся в избыточном количестве непосредственно взаимодействуют с органическими соединениями, вследствие чего теряется биологическая активность белков, ферментов, нуклеиновых кислот и т.д., и кроме того продукты перекисного окисления липидов токсичны, ингибируют пролиферацию и созревание клеток, обладают канцерогенными свойствами (М.К. Мустафина, 2002).

Антиоксиданты работают в комплексе и дополняют или поддерживают друг друга (Г.С. Кузнецова, 2004, Л.Г. Machlin, 1984) Все естественные антиоксиданты оказывают свое защитное действие совместно, поэтому снижение содержания одного повлечет нарушение всей антиоксидантной защиты в целом (Л.Ю. Карпенко, 2006)

При достаточно высоком содержании альфа-токоферола в организме образуется лишь небольшое количество продуктов ПОЛ, участвующих в регуляции многих физиологических процессов, в том числе: клеточного деления, ионного транспорта, обновления мембран клеток, в биосинтезе гормонов, простагландинов, в осуществлении окислительного фосфорилирования. Уменьшение же содержания этого антиоксиданта в тканях (обуславливающее ослабление антиокислительной защиты организма) приводит к тому, что продукты ПОЛ начинают производить вместо физиологического патологический эффект (В.С. Камышников, 2004).

Нарушение деятельности систем, контролирующих протекание окислительных свободнорадикальных реакций, в том числе мембранных структур клеток, приводит к резкому накоплению токсических перекисей. Следствием этого являются глубокие перестройки метаболизма клетки и в конечном итоге ее деградация и гибель (Ю.П. Козлов, 1975, Т.С. Кузнецова, 2004)

Неизвестны также последствия передозировки антиоксидантами (в том числе эмицидином) при любой патологии, как и применение их в физиологически нормальном состоянии организма, так как эмицидин является не нормализатором или стабилизатором, а ингибитором ПОЛ. А как

известно, продукты ПОЛ (в том числе свободные радикалы) являются необходимыми компонентами в обмене веществ, размножении, являются биологическими активными веществами, а также катализаторами и ингибиторами различных физиологических процессов (Л М Курик, 2006)

Активность СОД в крови повышается в 1,5-5 раз во всех случаях, когда в клетках нарастает концентрация супероксидных анионов (O_2^-), что наблюдается при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, легких, инфаркте миокарда и других заболеваниях сердца и сосудов, термических ожогах, болезнях печени, особенно при жировой дистрофии, при онкологических поражениях, химических отравлениях, эмоционально-болевыми и других стрессах. Снижение активности СОД отмечено при ишемии миокарда, печени, почек, скелетных мышц, хотя уровень липидных пероксидов в этих случаях возрастает. Аналогично снижается активность СОД при хроническом гепатите, фиброзе, циррозе, глубоких деструктивных поражениях печени. Повышение активности ГР отмечается на фоне повышения процессов ПОЛ, в частности при хроническом заболевании сердца, легких, печени.

На уровень глутатиона в крови влияет обеспеченность животных серосодержащими аминокислотами и серой. Его повышение в крови свидетельствует о выраженной защитной и детоксирующей силе организма (Архипов, А В 2004).

Поэтому, существующий сейчас пристальный интерес к исследованию клинического аспекта процесса цепного свободнорадикального перекисного окисления липидов во многом обусловлен тем, что усиление или ослабление активности реакций в указанном звене метаболизма способно существенно снизить резистентность организма к воздействию на него неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды, а также создать предпосылки к ускоренному развитию и усугублению тяжести течения различных патологических процессов.

Выводы

- 1 У клинически здоровых лошадей траккенской и орловской пород впервые определены показатели активности ферментов антиоксидантной системы крови: активность супероксиддисмутазы $1,251 \pm 0,091$ единиц активности/мг гемоглобина, каталазы $40,25 \pm 3,71$ мкмоль пероксида водорода/л \times мин $\times 10^3$, пероксидазы $7,077 \pm 0,423$ единиц оптической плотности/л \times с, глутатионредуктазы $315,3 \pm 7,59$ ммоль окисленного глутатиона/л $\times 5$ минут, концентрация восстановленного глутатиона $1,16 \pm 0,083$ моль/л
- 2 Установлены изменения показателей активности ферментов антиоксидантной системы крови при хронической эмфиземе легких: повышается активность ферментов СОД на 145,16%, пероксидазы на 7,63%, снижается активность ферментов каталазы на 13,42%, глутатионредуктазы на 31,11%, концентрация глутатиона восстановленного на 69,14%

- 3 Клиническая картина хронической эмфиземы легких выражается бочкообразным расширением грудной клетки, западением кожного покрова вдоль и позади реберной дуги, брюшным типом дыхания, западением межреберных промежутков, переполнением яремных вен и подкожных вен передней части грудной стенки, расширением ноздрей и серозными истечениями, кашлем, выдыхательной одышкой, громким, низким коробочным звуком, особенно в нижних краях легких, каудальным смещением задней границы легких на 1-4 межреберных промежутка, жестким везикулярным дыханием, учащением и ослаблением сердечных сокращений, дыхательных движений, усиленном диастолических тонов сердца
- 4 Определены морфофункциональные и биохимические изменения показателей крови у лошадей с хронической эмфиземой легких с увеличением содержания количества лейкоцитов до верхней границы нормы, моноцитов на 12,13 (%), содержания общего билирубина на 2,95 мкмоль/л, мочевины на 1,95 ммоль/л, креатинина на 12,7 мкмоль/л, общего белка на 2,23 г/л, альбумина на 5,13 г/л, глюкозы на 0,4 ммоль/л, холестерина на 0,27 ммоль/л, триглицеридов на 0,253 ммоль/л, Fe на 10,05 мкмоль/л, Ca на 0,22 ммоль/л, Mg на 0,35 ммоль/л, активности АСТ на 43,6 ед /л, ГГТ на 31,78 ед /л, щелочной фосфатазы на 104,5 ед /л и уменьшением содержания прямого билирубина на 1,6 мкмоль/л, фосфора на 0,525 ммоль/л, активности АЛТ на 4,87 ед/л, активности амилазы на 0,21 ед/л, активности ЛДГ на 36,6 ед/л, активности КФК на 39,23 ед/л
- 5 Установлена динамика морфофункциональных и биохимических показателей крови у лошадей с хронической эмфиземой легких после комплексного внутриветеринарного лечения снижается количество лейкоцитов на 4,88%, эозинофилов на 0,34%, моноцитов на 10,67%, концентрация билирубина общего на 14,17%, мочевины на 25,63%, креатинина на 2,16%, триглицеридов на 48,88%, кальция на 11,6%, магния на 50,43%, активность АСТ на 2,87% и повышается гематокрит на 1,53%, гемоглобин на 8,09%, количество эритроцитов на 4,53%, сегментоядерных нейтрофилов на 9%, лимфоцитов на 2%, значение СОЭ на 6%, содержание билирубина прямого на 43,4%, фосфора на 27,61%, Fe на 37,54%, общего белка на 7,85%, альбумина на 12,05%, глюкозы на 7,07%, активность АЛТ на 41,16%, амилазы на 1,73%, креатинфосфокиназы на 67,11%, ЛДГ на 18,05%
- 6 Выявлено, что исследование активности ферментов антиоксидантной системы крови лошадей с хронической эмфиземой легких в сочетании с морфофункциональными и биохимическими показателями крови более информативны для постановки диагноза и оценки лечебной эффективности данной патологии
- 7 Комплексное лечение лошадей с хронической эмфиземой легких оказывает более выраженный терапевтический эффект, сокращает в два раза срок лечения заболевания, составляет 42,2% экономической

эффективности и приводит к нормализации показателей активности ферментов антиоксидантной системы крови больных лошадей активность фермента СОД снижается на 56,6%, активность фермента каталазы повышается на 51,85% активность фермента пероксидазы повышается на 50,58%, активность фермента глутатионредуктазы повышается на 41,94%, концентрация глутатиона восстановленного повышается на 177,93%

- 8 Подтверждена терапевтическая эффективность дозы препарата эмицидин для лошадей с хронической эмфиземой легких на курс лечения в условиях производства с использованием 500 мг утром и вечером с кормом

Рекомендации по использованию научных выводов.

- 1 Для прогнозирования тяжести течения и патогенеза хронической эмфиземы легких у лошадей, а также исхода данного заболевания необходимо использовать данные показатели лабораторных исследований крови в условиях производства
- 2 Применять эмицидин как обязательный компонент комплексной терапии в лечении самого широкого спектра заболеваний
- 3 Разработанная практическая схема лечения хронической эмфиземы легких у лошадей может с успехом применяться для широкого внедрения в практику специалистами ветеринарного профиля
- 4 Применять эмицидин в тяжелых и терминальных состояниях в двойных и тройных дозах
- 5 Не рекомендовано применение эмицидина здоровым животным

Список работ, опубликованных работ по теме диссертации

- 1 Шатилов, А В Роль антиоксидантов в организме в норме и при патологии /А В Шатилов, О Г Богданова, А В Коробов //Ветеринарная патология - 2007 - Вып 21 - №2 - С 207-210
- 2 Шатилов, А В Терапевтическая эффективность эмицидина при лечении лошадей с хроническими заболеваниями легких /А В Шатилов //Ветеринарная патология - 2008 - Вып 25 - С.117-119
- 3 Богданова, О Г, Шатилов, А В Сравнительная картина крови кобыл на разных сроках жеребости / Материалы седьмой научно-практической конференции по болезням лошадей, /Болезни лошадей диагностика, профилактика, лечение, 16-19 августа 2006 г, г Москва – М, 2006 – С 91-93

Подп в печать 08 10 2008 Формат 60x90/16 Объем 1 0 п л

Бумага офисная Печать цифровая

Тираж 150 экз Заказ № 783

ГОУВПО “Государственный университет управления”

Издательский дом ГОУВПО “ГУУ”

109542, Москва, Рязанский проспект, 99, Учебный корпус, ауд 106

Тел /факс (495) 371-95-10, e-mail drgc@guu.ru

www.guu.ru