



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18556 (13) U  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/04 (2006.01)  
A61K 39/21

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ НАПРЯМУ РОЗВИТКУ ЛЕЙКОЗНОГО ПРОЦЕСУ У КОРІВ

1

(21) u200605062  
(22) 06.05.2006  
(24) 15.11.2006  
(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.  
(72) Кісера Ярослав Васильович, Кравців Роман Йосипович  
(73) ЛЬВІВСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ІМ. С.З. ГЖИЦЬКОГО  
(57) Спосіб прогнозування напрямку розвитку лейкозного процесу у корів, що включає відбір проб молока досліджуваних корів, аналіз їх біохімічних показників, який **відрізняється** тим, що в пробах сироватки молока визначають загальний рівень

2

амінокислот та співвідношення їх замісних до незамісних форм (у %) та аналізують одержані результати досліджень, при цьому вважають, що наявність в сироватці молока загальної кількості амінокислот в межах 986-992 мг % при співвідношенні замісних до незамісних 40,4х59,6 % свідчить про розвиток лейкозного процесу від передлейкозної стадії до ранньої стадії лейкозного процесу, а зниження загального рівня амінокислот до 680-692 мг % при співвідношенні замісних до незамісних 42,9х57,1 % свідчить про розвиток активної стадії лейкозу.

Корисна модель відноситься до галузі ветеринарної медицини, зокрема епізоотології, а саме до способів прогнозування напрямку розвитку лейкозного процесу у корів. Спосіб може бути застосований спеціалістами ветеринарної медицини в господарствах різних форм власності та лабораторіях ветеринарної медицини для своєчасного визначення напрямку розвитку лейкозного процесу у корів і прийняття відповідних заходів стосовно епізоотичної ситуації у досліджуваному господарстві.

Відомий серологічний спосіб прижиттєвої діагностики лейкозу, який базується на проведенні реакції імунодифузії (РІД). Реакція полягає у взаємодії антигену з антитілом в агаровому гелі з утворенням специфічних ліній (смуг) преципітації [Б.Т. Стегній „Оцінка методів концентрування і очищення культурального вірусу лейкозу великої рогатої худоби // „Вісник сільськогосподарської науки”, травень, 2004. - С.36-39]. Для здійснення способу використовують спеціальний набір препаратів для серологічної діагностики лейкозу. Недоліком способу є недостатня його чутливість, що негативно відбивається на своєчасності і якості оздоровчих заходів.

Крім цього, відомий спосіб потребує додаткових витрат, пов'язаних з взяттям і доставкою проб крові. Відомий також спосіб діагностики лейкозу у великої рогатої худоби за допомогою імуноферментної тест-системи для визначення рівня протилейкозних антитіл в сироватках крові і молока [Деклараційний патент України №61538А]. Спосіб

включає використання в тест системі імуноадсорбентів з нанесеними рекомбінантними антигенами, виділеними з культури FLK, що продукує вірус лейкозу великої рогатої худоби, а у складі кон'югатів використовують моноклональні антитіла, мічені пероксидазою. Спосіб високочутливий і ефективний для діагностики лейкозу. Недоліком способу є складність у його здійсненні і висока вартість реактивів, необхідних для проведення досліджень.

Найбільш близьким по суті до способу, що заявляється, є „Спосіб виявлення і оцінки ступеню ураження корів лейкозом” [Деклараційний патент України на корисну модель №7364]. Відомий спосіб включає відбір проб молока і крові оцінюваних корів, визначення в них концентрації загального білку і його фракцій, а ступінь ураженості корів лейкозом встановлюють, аналізуючи одержані результати біохімічних досліджень, при цьому стан корів, в пробах крові яких виявлено концентрацію загального білка в межах 7,48-7,55г%, глобулінів - 4,34-4,37г%; гама-глобулінів 2,55-2,65г%, а в пробах молока встановлений рівень загального білка сироватки молока 0,86-0,93г%, альфалактоальбумінів від 0,169 до 0,174г%, вважають перед лейкозним;

стан корів, в пробах крові яких виявлено концентрацію загального білка в межах 7,27-7,32г%, глобулінів - 4,1-4,17г%; гама-глобулінів 2,40-2,43г%, а в пробах молока встановлений рівень загального білка сироватки молока 0,77-0,84г%,

(13) U  
(11) 18556  
(19) UA

альфалактоальбумінів від 0,165 до 0,173г%, вважають ранньою стадією захворювання;

а стан корів, в пробах крові яких виявлено концентрацію загального білка в межах 7,08-7,10г%, гама-глобулінів 2,08-2,13г%, а в пробах молока встановлений рівень загального білка сироватки молока в межах 2,54-2,61г%, альфалактоальбумінів від 0,165 до 0,173г%, вважають станом активної стадії лейкозу.

Спосіб забезпечує можливість виявлення біохімічних змін в крові і молоці на ранніх стадіях розвитку захворювання. Імовірність виявлення змін при дослідженні молока і крові досягає 80-85%. Недоліком способу є необхідність одночасного відбору проб молока і крові, що вимагає додаткових затрат при його здійсненні. Крім цього, відомий спосіб є недостатньо ефективним і об'єктивним.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки найбільшого аналога і дає можливість на ранніх стадіях лейкозного процесу визначити напрямки розвитку захворювання та своєчасно впровадити протиепізоотичні заходи. Спосіб зручний у застосуванні і не вимагає відбору і обробки проб крові та дає можливість своєчасно виявити зміни в процесах синтезу та співвідношенні заміennих і незамінних амінокислот. Імовірність виявлення таких змін при дослідженні проб сироватки молока досягає 80-90%.

В основу корисної моделі покладено завдання створити новий ефективний спосіб раннього прогнозування напрямку розвитку лейкозного процесу у лактуючих корів, економічно вигідний і зручний у застосуванні.

Технічний результат досягають тим, що в пробах сироватки молока визначають загальний рівень амінокислот та співвідношення їх заміennих до незамінних форм (у %) та аналізують одержані результати досліджень, при цьому вважають, що наявність в сироватці молока загальної кількості амінокислот в межах 986-992мг% при співвідношенні заміennих до незамінних 40,4х59,6% свідчить про розвиток лейкозного процесу від передлейкозної стадії до ранньої стадії лейкозного процесу, а зниження загального рівня амінокислот до 680-692мг% при співвідношенні заміennих до незамінних 42,9х57,1% свідчить про розвиток активної стадії лейкозу.

Лейкоз великої рогатої худоби характеризується повільним розвитком захворювання і може протікати роками без певних клінічних ознак, хоча тварина в цей час є джерелом збудника хвороби. При цьому вірус виділяється у зовнішнє середовище у лактуючих корів з молоком. Ступінь порушення білкового обміну в тварин, хворих лейкозом, знаходиться в прямій залежності від стадії перебігу лейкозного процесу. Зміни, що відбуваються в обміні білків лактуючих корів, хворих на лейкоз, обов'язково супроводжуються змінами амінокислот та співвідношенні їх заміennих та незамінних форм у тваринницькій продукції, зокрема в молоці. Такі зміни в кількості амінокислот та співвідношенні їх форм у молоці лактуючих корів спостерігаються вже на ранніх стадіях розвитку лейкозного процесу.

Отже, заявлений нами спосіб дає можливість прогнозувати напрямки розвитку лейкозного про-

цесу на підставі біохімічних змін в молоці корів. Імовірність виявлення таких змін при дослідженні молока коливається в межах 80-90%.

В господарстві, молочне стадо в якому є підозрілим на лейкоз, для підтвердження діагнозу і прогнозування напрямку розвитку лейкозного процесу заявлений спосіб здійснюють наступним чином:

1. Відбирають проби молока для досліджень.

2. Одержують сироватку молока та здійснюють її гідроліз.

3. Мікрометодом низхідної розподільчої хроматографії на папері в гідролізатах сироватки молока корів визначають кількість заміennих і незамінних амінокислот.

4. Аналізують одержані результати досліджень: загальну кількість амінокислот та співвідношення їх заміennих і незамінних форм, при цьому вважають, що наявність в сироватці молока загальної кількості амінокислот в межах 986-992мг% при співвідношенні заміennих до незамінних 40,4х59,6% свідчить про розвиток лейкозного процесу від передлейкозної стадії до ранньої стадії лейкозного процесу, а зниження загального рівня амінокислот до 680-692мг% при співвідношенні заміennих до незамінних 42,9х57,1% свідчить про розвиток активної стадії лейкозу.

Ефективність заявленого способу прогнозування напрямку розвитку лейкозного процесу у корів підтверджена прикладом конкретного виконання.

Дослідження проводились протягом 2000-2004 років в Інституті патології крові та трансфузійної медицини Академії медичних наук України (м.Львів) і у Львівській національній академії ветеринарної медицини імені С.З.Гжицького. в неблагополучних щодо лейкозу господарствах - „Тарасівна”, „Поділля” і „Славутич” Збаразького району Тернопільської області були проведені дослідження на 75 клінічно здорових та хворих лейкозом коровах чорно-рябої породи, віком 5-10 років.

Було сформовано п'ять дослідних груп за результатами гематологічних досліджень. Перша група - здорові тварини - кількісні показники крові коливались в межах фізіологічної норми. Друга група - інфіковані тварини - РІД позитивно реагуючі, у яких кількісні показники крові були в межах фізіологічної норми. Третя група - передлейкозна стадія - тварини цієї групи характеризувались лімфоцитозом - 9,58тис/мкл, кількість лейкоцитів коливалась від норми до 12-15тис/мкл. За цими показниками тварини згідно „лейкозного ключа” кваліфікувались як підозрілі в захворюванні лейкозом. Четверта група - рання стадія лейкозу - до цієї групи відбирались тварини, які характеризувались сублейкемічним рівнем лейкоцитозу в крові, п'ята група - активна стадія лейкозу - цю групу формували тварини, в яких виявили низькі показники еритроцитів - 4,80млн/мкл і гемоглобіну - 6,89г%, що відображає анемію. Кількість лейкоцитів - 97,56тис/мкл, лімфоцитів - 94,5тис/мкл.

Досліджувалось молоко мікрометодом низхідної розподільчої хроматографії на папері. В гідролізатах сироватки молока корів визначали кількість 7-и заміennих (аспарагінова, гліцин, глютамінова, аланін, серин, тирозин, цистеїн) і 8-й незамінних

амінокислот (аргінін, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, фенілаланін). Результати досліджень наведені в таблицях 1, 2.

Проведені дослідження показали, що в групі здорових тварин кількість амінокислот у різних тварин і при кожному дослідженні коливалась в широких межах, що, на наш погляд, було пов'язано з індивідуальними особливостями і фізі-

ологічним станом організму в період досліджень, при інших дослідженнях кількість амінокислот коливалась від мінімальних до максимальних величин. Аналогічні зміни кількості амінокислот виявлені і у корів в динаміці розвитку лейкозного процесу (таблиці 1).

Таблиця 1

Зміни рівня окремих амінокислот в сироватці  
молока корів при різних напрямках лейкозного процесу,  $M \pm m$ ,  $n=10$ , мг%

| Амінокислоти           | Здорові тварини | Інфіковані тварини | Стадії лейкозного процесу |              |               |
|------------------------|-----------------|--------------------|---------------------------|--------------|---------------|
|                        |                 |                    | передлейкозна             | рання        | активна       |
| Замінні амінокислоти   |                 |                    |                           |              |               |
| Аланін                 | 35,26±10,42     | 34,41±9,76*        | 55,64±15,31*              | 48,59±14,24* | 43,91±10,72*  |
| Аспарагінова кислота   | 58,61±11,66     | 60,28±16,38*       | 54,46±13,73*              | 68,71±16,09* | 51,33±12,29*  |
| Гліцин                 | 66,58±11,73     | 60,71±12,91*       | 98,68±29,39*              | 62,57±13,75* | 46,68±11,71*  |
| Глютамінова кислота    | 58,95±9,09      | 57,84±10,69*       | 59,47±13,39*              | 70,39±14,09* | 46,73±12,13*  |
| Серин                  | 39,87±9,68      | 36,58±8,04*        | 54,01±21,42*              | 35,51±10,23* | 18,36±6,79**  |
| Тирозин                | 102,48±27,86    | 95,85±24,07*       | 70,76±19,54*              | 61,38±15,65* | 47,96±13,38** |
| Цистеїн                | 45,63±9,35      | 47,87±13,67*       | 43,15±12,55*              | 53,74±13,94* | 39,24±11,85*  |
| Незамінні амінокислоти |                 |                    |                           |              |               |
| Аргінін                | 71,65±14,41     | 69,13±14,26*       | 78,39±15,67*              | 59,78±14,37* | 44,19±12,37*  |
| Валін                  | 43,88±8,98      | 44,99±8,53*        | 56,60±12,98*              | 58,72±15,57* | 50,05±11,19*  |
| Ізолейцин              | 70,64±13,79     | 70,29±5,73*        | 66,28±14,66*              | 83,83±21,31* | 40,72±13,09*  |
| Лейцин                 | 79,14±15,17     | 78,79±17,45*       | 74,78±16,27*              | 92,33±21,86* | 55,46±13,64*  |
| Лізин                  | 103,21±19,76    | 101,75±12,5*       | 129,38±26,75*             | 119,59±17,5* | 68,33±9,76*   |
| Метіонін               | 39,67±7,53      | 40,78±8,96*        | 52,39±11,94*              | 54,51±12,43* | 45,84±9,87*   |
| Треонін                | 36,85±7,54      | 38,97±7,85*        | 34,72±6,86*               | 51,67±11,78* | 44,31±13,16*  |
| Фенілаланін            | 57,72±12,73     | 57,95±18,34        | 53,48±17,73*              | 70,93±19,16* | 42,90±12,07*  |

Примітка: достовірність різниць із показниками здорових тварин: \* -  $P>0,1$ ; \*\* -  $P>0,05$ .

За характером кількісних змін амінокислот у групах досліджуваних корів в динаміці розвитку лейкозного процесу можна виділити наступні особливості:

- по-перше, спостерігається наростання кількості глютамінової кислоти, метіоніну і валіну і передлейкозній і ранній стадії лейкозу порівняно з показниками здорових і інфікованих тварин з наступним зниженням її кількості в активній стадії захворювання;

- по-друге, збільшення кількості аланіну, гліци-

ну, серину, лізину в передлейкозній стадії з наступним зниженням їх показників і ранній і активній стадіях захворювання;

- по-третє, зменшення кількості аспарагінової кислоти, цистеїну, лейцину, ізолейцину і фенілаланіну в сироватці молока в передлейкозній стадії, збільшення в ранній стадії і в активній стадії зниження їх рівня нижче показників здорових тварин, тоді як кількість треоніну в активній стадії вища за показники у здорових тварин.

Таблиця 2

Зміни в кількості і співвідношеннях амінокислот в сироватці  
молока корів за різних напрямків розвитку лейкозного процесу

| Показники, одиниці виміру                           | Здорові тварини | Інфіковані тварини | Стадії лейкозного процесу |               |               |
|---|-----------------|--------------------|---------------------------|---------------|---------------|
|   |                 |                    | передлейкозна             | рання         | активна       |
| Загальна кількість амінокислот, мг%                 | 910,14±189,70   | 896,19±189,14      | 982,19±248,19             | 992,25±232,01 | 686,06±173,96 |
| Кількість замінних амінокислот, мг%                 | 407,38±89,79    | 393,54 ±95,52      | 436,17±125,33             | 400,89±97,99  | 294,26±78,87  |
| Кількість незамінних амінокислот, мг%               | 502,76±99,91    | 502,65±93,62       | 546,02±122,86             | 591,36±134,02 | 391,80±95,09  |
| Співвідношення замінних і незамінних амінокислот, % | 44,76x55,24     | 43,91x56,09        | 44,42x55,58               | 40,40x59,60   | 42,89x57,11   |

Значне зменшення кількості амінокислот в активній стадії лейкозу порівняно з нормальними показниками відбувається в кількості гліцину на 19,9мг%, ізолейцину - 29,92мг%, лейцину - 23,68мг%, тирозину - 54,52мг%, аргініну - 27,46мг%, серину - 21,51 мг% і фенілаланіну - 14,82мг%, а збільшення кількості валіну на 6,17мг%, метіоніну на 6,17мг%, аланіну - на 8,65мг% і треоніну - на 7,46мг%.

Як видно з таблиці №2, у хворих тварин залежно від стадії розвитку лейкозного процесу, суттєві зміни проходять і в загальній кількості амінокислот. Кількість їх в групі здорових тварин склала  $910,14 \pm 89,70$ мг%, у інфікованих -  $896,19 \pm 189,14$ мг%, в передлейкозній стадії -  $982,19 \pm 248,19$ мг%, в ранній стадії -  $992,25 \pm 232,01$ мг%, а в активній стадії спостерігається різке зниження їх вмісту до  $686,06 \pm 173,96$ мг%, тобто на  $224,08$ мг% (24,62%) порівняно з показниками у здорових тварин.

Подібні зміни відмічені і в сумі замісних і незамінних амінокислот. Так, кількість незамінних амінокислот в середньому по групах корів підвищилась з  $502,76 \pm 99,91$ мг% до  $591,36 \pm 134,02$ мг% в ранній стадії лейкозу. В активній стадії кількість їх знизилась до  $391,80 \pm 95,09$ мг%, тобто на  $110,96$ мг% (22,07%).

Показники замісних амінокислот підвищились від рівня у здорових корів ( $407,38 \pm 89,79$ мг%) до передлейкозного стану - ( $436,17 \pm 125,33$ мг%) на  $28,79$ мг%. В ранній стадії спостерігається їх зниження до вихідних величин ( $400,89 \pm 97,99$ мг%). Різке зниження кількості замісних амінокислот настає в активній стадії на  $141,91$ мг% і складає  $294,26 \pm 78,87$ мг%, що на  $113,12$ мг%, або на 27,77% нижче показників здорових корів. При цьому необхідно відмітити, що у співвідношенні у від-

сотках загальна кількість незамінних амінокислот переважає на замісними. Так, якщо співвідношення у відсотках замісних і незамінних в групі здорових корів складає  $44,76 \times 55,24$ , то у інфікованих ( $43,91 \times 56,09$ ) і у тварин в передлейкозному стані ( $44,42 \times 55,58$ ) спостерігаються незначні відхилення, в той час як у тварин ранньої ( $40,40 \times 59,60$ ) і активної ( $42,89 \times 57,11$ ) стадій розвитку лейкозного процесу кількість незамінних амінокислот перевищує показники групи здорових тварин, зниження кількості замісних амінокислот в ранній і активній стадіях можна пояснити посиленням використання їх при розвитку патологічного процесу, коли організм неспроможний виділяти їх в достатній кількості. Можливо також, що в організмі хворої тварини проходить перерозподіл їх співвідношення, що вказує на порушення метаболізму амінокислот.

Отже, проведені дослідження свідчать про наступне:

1. В сироватці молока корів досліджено 15 амінокислот, сума яких склала  $910,14 \pm 189,70$ мг%, в тому числі замісних  $407,38 \pm 89,79$  і незамінних  $502,76 \pm 99,91$ мг% у співвідношенні  $44,76 \times 55,24$ , а в групах корів, які знаходились в передлейкозному стані і в ранній стадії лейкозу загальна кількість амінокислот підвищується до  $992,25 \pm 232,01$ мг% за рахунок окремих замісних (аланін, гліцин, глутамінова і аспарагінова кислоти, цистеїн) і незамінних (аргінін, валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін) амінокислот.

2. В активній стадії лейкозу настає значне зменшення загальної кількості амінокислот до  $686,04 \pm 173,96$ мг%, тобто на  $224,10$ мг% нижче рівня у здорових корів за рахунок замісних (аспарагінової кислоти, гліцину, серину, тирозину, цистеїну) і замісних (аргініну, ізолейцину, лейцину, лізину і фенілаланіну) амінокислот.