



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35389 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 39/12
A61K 33/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ БІОХІМІЧНОЇ ОЦІНКИ РІВНЯ МІНЕРАЛЬНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ В ОРГАНІЗМІ ТВАРИН

1

(21) u200805909
(22) 06.05.2008
(24) 10.09.2008
(46) 10.09.2008, Бюл.№ 17, 2008 р.
(72) ДОЛЕЦЬКИЙ СТАНИСЛАВ ПАВЛОВИЧ, UA
(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ (ІВМ)
УААН, UA
(57) Спосіб біохімічної оцінки рівня мінеральної недостатності в організмі тварин, що включає встановлення і підтвердження діагнозу за допомогою хімічного методу, який **відрізняється** тим, що

2

після встановлення діагнозу комплексометричним методом та методом з використанням ванадат-молібденового реактиву подальший контроль ступеня мінеральної недостатності проводиться шляхом визначення концентрації молекул середньої маси, які характеризують рівень ендогенної інтоксикації та знаходяться в корелятивному зв'язку з рівнем мінеральної недостатності за вмістом загального кальцію і неорганічного фосфору в сироватці крові тварин.

Корисна модель відноситься до галузі ветеринарної біохімії, зокрема, клінічної біохімії, і може бути використаний в роботі наукових та науково-виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

Ендогенна інтоксикація є неспецифічним синдромом, що характерний для багатьох патологічних станів. Застосовуються різні методи оцінки ступеню ендогенної інтоксикації. Це визначення певних показників лейкоцитарних реакцій, діагностика з використанням біологічних об'єктів, вивчення певних характеристик еритроцитів, використання (зокрема, для ВРХ) тесту альбумінових показників [1-2]. Інформативним є визначення показників п-гідрокислювання та N-деметилування в мікросомах печінки та стану окиснювальних систем ендоплазматичного ретикулуму печінки [3], проте отримання таких показників є методично складним. Одним із показників рівня ендогенної інтоксикації вважають рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), зокрема, кінцевого метаболіта - малонесувальних діальдегідів (МСМ) ендогенної інтоксикації є рівень молекул середньої маси (МСМ), до яких входять олігопептиди, похідні глюкуронової кислоти, нуклеопептиди, олігоцукри [6]. Рівень МСМ найчастіше визначають в сироватці крові, співставлення рівня МСМ із загальноприйнятими ознаками активності запалення - церулоплазміном, нейраміновою кислотою та ін. показало наявність відповідності між ними.

Відомі способи оцінки рівня мінеральних речовин з використанням хімічних методів. Ці способи

є специфічними і використовуються як діагностичні водночас з виявленням певних клінічних ознак патології. Недоліками вказаних способів є методична складність, вони потребують значного часу, зокрема, для підготовки компонентів реакції.

Найбільш близьким за технічною суттю до заявляемого способу є метод визначення загального кальцію в сироватці крові комплексометричним методом з індикатором флуорексоном та визначення неорганічного фосфору з ванадат-молібденовим реактивом [7, С.106-111].

Принцип визначення загального кальцію в сироватці крові за відомим способом полягає в тому, що водні розчини флуорексону в сильнолужному середовищі не дають флуоресценції, проте за цих самих умов з кальцієм флуорексон утворює комплекси, які флуоресціюють.

Необхідні реактиви: 0,1 н. розчин трилону Б; 0,005 н. розчин трилона Б; індикаторна суміш - індикатор флуорексон, хлористий кальцій; розчин 1 н. калію їдкою; стандартний 100мг%-вий розчин кальцію; робочий 10мг%-вий розчин кальцію.

Хід визначення. До стаканчика вносять 20мл дистильованої води, 5мл розчину KCl та кілька кристаликів індикаторної суміші. З'являється флуоресценція. Для зв'язування кальцію до суміші мікробюреткою прибавляють каплями розчин трилона Б до зникнення флуоресценції та появи рожевого забарвлення. Після зв'язування кальцію, що знаходиться в розчині KCl, до цього ж стаканчика добавляють 0,5мл сироватки крові і знову

(13) U

(11) 35389

(19) UA

титрують розчином трилону Б до зникнення флуоресценції та появи рожевого забарвлення.

Потім проводять розрахунок за формулою: $Ca (mg\%) = a \times 20$, де

a - кількість розчину трилону Б, що витратили на титрування сироватки крові (мл); 20 - коефіцієнт для перерахунку в мг%, якщо титр 0,005 н. розчину трилону Б дорівнює 1.

Принцип визначення неорганічного фосфору в сироватці крові полягає в тому, що фосфор у безбілковому фільтраті дає лімонно-жовте забарвлення з ванадат-молібденовим реактивом. Ступінь забарвлення визначають на фотоелектроколориметрі.

Необхідні реактиви: 20%-вий розчин трихлороцтової кислоти (ТХО); реактив на фосфор (готується змішуванням 500мл 0,234%-вого розчину ванадата аммонія, 1000мл 2,5 н. розчину HCl і 1000мл 3,53%-вого розчину молібденовокислого амонію); основний стандартний розчин фосфору; 5 мг%-вий робочий стандартний розчин фосфору.

Обладнання: фотоелектроколориметр, колби, електроплитка, центрифуга.

Хід визначення. В пробірку вносять 2,5мл дистильованої води, 0,5мл сироватки, 2мл розчину ТХО, перемішують і через 10хв центрифугують 15хв при 3000об/хв. Потім беруть 2,5мл прозорого центрифугату і 2,5мл реактиву на фосфор, перемішують і через 10хв колориметрують проти дистильованої води. Паралельно готують стандартну пробу: 0,5мл робочого стандартного розчину фосфору, 2,5мл дистильованої води, 2мл розчину ТХО. Колориметрують у тому ж самому режимі.

Розрахунок проводять за формулою:

$X = A/B \times 5$, де

X - кількість мг фосфору в 100мл сироватки, A - екстинкція зразку, B - коефіцієнт для переведення в мг%.

Недоліком відомого способу є те, що він потребує досить значного часу для приготування реактивів, постановки реакції та аналізу отриманих результатів. Крім того, визначення загального кальцію і неорганічного фосфору є досить коштовним.

Метою корисної моделі є розробка швидкого способу біохімічної оцінки рівня порушення мінерального обміну за вмістом кальцію і фосфору в організмі великої рогатої худоби.

Поставлена задача вирішується тим, що після визначення концентрації в сироватці крові загального кальцію і неорганічного фосфору контроль за ступенем їх вмісту здійснюється за визначення концентрації молекул середньої маси (МСМ) в сироватках крові тварин експрес-методом.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином.

Визначення загального кальцію та неорганічного фосфору проводимо за стандартними методиками, як описано вище [7].

В подальшому, після встановлення мінеральної недостатності за вмістом кальцію і фосфору контроль за ступенем цієї недостатності проводимо за рівнем молекул середньої маси (МСМ), що визначається біохімічним експрес-методом [8-10]

Експрес-метод визначення рівня МСМ в сироватці крові.

Необхідне обладнання: центрифуга, спектрофотометр.

Реактиви: 10% трихлороцтова кислота, дистильована вода.

До сироваток крові додають 10%-вий розчин трихлороцтової кислоти (ТХО). Співвідношення сироватки до кислоти - 1:0,5. Потім центрифугують при 3000g протягом 20 хвилин. Отриманий депротейнізований супернатант розводять дистильованою водою: до 0,5мл надосаду додають 4,5мл води. Надосад має бути прозорим, при необхідності центрифугування слід повторити. Після цього проводять УФ-спектрофотометрію надосаду, звільненого від грубодисперсних білків. Довжину хвилі використовують 240нм. За оптичний контроль править розчин ТХО відповідного розведення. Рівень МСМ виражають в умовних одиницях оптичної щільності (ум. од.)

Переваги оцінки ступеню мінеральної недостатності за визначенням МСМ - швидке виконання аналізу (протягом 30 хвилин), наочність і інформативність амплітуди коливань показників екстинкції, які визначають спектрофотометрично. Методика дешева, потребує мінімуму реактивів. Крім того, ріст пула МСМ випереджає зміни інших лабораторних показників, а також клінічні ознаки патології. Слід зазначити, що зберігання при -10°C протягом 5-6 діб правильно приготовленої та замороженої сироватки крові не впливає на оптичну щільність кислоторозчинної фракції сироватки крові.

Нашими дослідженнями встановлено наявність позитивної кореляції між ступенем мінеральної недостатності за вмістом кальцію і фосфору та рівнем показника МСМ в сироватці крові великої рогатої худоби.

Кореляційний аналіз проводили з використанням програми Microsoft Excel за формулою

$$r_{X,Y} = \frac{\text{Cov}(X,Y)}{\sigma_X \cdot \sigma_Y}, \text{ де } -1 \leq r_{X,Y} \leq 1$$

$$\text{Cov}(X,Y) = 1/n \sum_{i=1}^n (X_i - M_X)(Y_i - M_Y)$$

При лабораторному дослідженні сироватки крові корів було встановлено гіпокальціємію різного ступеню у 28 з 30 обстежених лактуючих тварин. Аналіз результатів експериментальної оцінки мінерального забезпечення у великої рогатої худоби показав наявність суттєвої зворотної кореляції вмісту загального кальцію в крові з рівнем ендогенної інтоксикації за концентрацією молекул середньої маси (МСМ) $-r = 0,860$ до $-0,746$. Показник визначено при зниженні загального кальцію в сироватці крові від 2,5-3,13ммоль/л (норма) до 1,5-2,3ммоль/л при середньому значенні по групі $1,78 \pm 0,05$ ммоль/л. Слід згадати, що іони кальцію здатні підвищувати рівень захисних функцій організму, зокрема, при зниженні концентрації іонів кальцію збільшується проникність клітинних мембран для ендогенних токсинів. Показник МСМ в сироватці крові корів був підвищений від 300-330 у.о. (норма) до 380-470 у.о.

Встановлений вміст неорганічного фосфору в сироватці крові корів теж був знижений (у 27 голів з 30 обстежених) і коливався у досить значних межах. Було виявлено значну зворотну кореляцію

вмісту фосфору з рівнем ендogenousної інтоксикації за концентрацією МСМ, а саме: ρ = від - 0,760 до - 0,650. Показник встановлено при зниженні вмісту фосфору від 1,45-1,94ммоль/л (норма) до 0,45-1,35ммоль/л при середньому значенні $0,80 \pm 0,03$ ммоль/л. Рівень МСМ в сироватці крові був підвищений від 300-330 у.о. (норма) до 370-450 у.о. Аналіз результатів експериментальної оцінки 75 зразків крові тварин показав наявність позитивної кореляції титру антитіл з показником МСМ (в умовних одиницях) ($\rho=0,6-0,7$).

Таким чином, спосіб, який пропонуємо, забезпечує, в порівнянні з прототипом, скорочення часу на тестування, значне спрощення методичної та матеріальної бази аналізів. Крім того, використання показника МСМ розширює можливості застосування способу, оскільки динаміка показника МСМ, який визначено в будь-якій біологічній рідині, може бути екстрапольована на всі клітини організму (11). В залежності від величини коефіцієнта кореляції можливо оцінювати рівень фосфорно-кальцієвого обміну у тварин в цілому по гурту.

Спосіб технологічно нескладний, вимагає обладнання вітчизняного виробництва і може бути використаний в роботі наукових і виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

Джерела інформації:

1. Козенко О. В. Рівень ендogenousної інтоксикації організму ВРХ під впливом сезонного, технологічного та екологічного факторів / Наукові праці Полтавської державної аграрної академії. - т.2 (21). - 2002 Полтава. - С.275-277.

2. Борченко Р. В., Киселева Р. Е., Кузьмичева Л. В. Оценка тяжести заболевания крупного рогатого скота на основе эффективной концентрации альбумина сыворотки крови / Биология - наука XXI века. Пушино, 2003. - С.11.

3. Попова Е. М., Сокирко Т. О. Особливості мікрсомальних процесів за умов інтоксикації інфек-

ційного генезу / Тр. VIII Укр. біохім. З'їзду. - Київ, 1997.

4. Степанова И. П., Дмитриева Л. М., Патюков А. Г. и др. Взаимосвязь между пероксидным окислением липидов, активностью антиоксидантной системы защиты и содержанием веществ низкой и средней молекулярной массы при интоксикации животных ацетальдегидом // С.-х. биология, 2004, №6. - С.16-19.

5. Рецкий М. И., Бузлама В. С., Шахов А. Г. Значение антиоксидантного статуса в адаптивной гетерогенности и иммунологической резистентности животных /Мат. Межд. научно-практ. конф. Актуальные вопросы болезней молодняка в современных условиях 23-25 сент.2002г. Воронеж. - С.33-36.

6. Сокирко Т. О. Діагностична цінність показника рівня ендogenousної інтоксикації / Вет. біотехнологія - 2003.- №3. - С.139-144.

7. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии /И. П. Кондрахин, Н. В. Курилов, А. Г. Малахов и др.// М., Агропромиздат, 1985. - 106-111.

8. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: метод, рекомендации /Габриэлян Н. И., Левицкий Э. Р., Дмитриев А. А. и др./ Москва - 1985

9. Комаров В. Т., Савченко Р. П., Татарченко И. П., Прокаева П. А. и др. //Клин. лаб. диагн. - 2001. - №8. С.18-22.

10. Сокирко Т. О., Синицин В. А., Долецький С. П., Віщур О. І. Інтегральний метод оцінки рівня ендogenousної інтоксикації за концентрацією в сироватці крові тварин сполук з низькою та середньою молекулярною масою: метод, рекомендації. Київ - 2008.

11. Бурмистров С. О., Габелова К. А., Андреева А. А., Опарина Т. Н., Арутюнян А. В.// Клин. лаб. диагностика. - 2001. - №6. - С.10-12.