



УКРАЇНА

(19) UA (11) 65511 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A01K 67/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ НЕГАТИВНОГО ВПЛИВУ НІТРИТІВ НА ОРГАНІЗМ СВИНЕЙ

1

2

(21) u201105681

(22) 04.05.2011

(24) 12.12.2011

(46) 12.12.2011, Бюл.№ 23, 2011 р.

(72) ЛЕСЬКІВ ХРИСТИНА ЯРОСЛАВІВНА, ГУТИЙ БОГДАН ВОЛОДИМИРОВИЧ, ГУФРІЙ ДМИТРО ФЕДОРОВИЧ

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМ. С.З. ГЖИЦЬКОГО

(57) Спосіб оцінки ступеня негативного впливу нітритів на організм свиней, який базується на аналізі системи антиоксидантного захисту за активністю ферментів крові, який **відрізняється** тим, що додатково визначають ферментну активність глутатіонпероксидази та супероксиддисмутази і за комплексною картиною активності ферментів судять про ступінь негативного впливу нітратного навантаження, при цьому:

тварин, у яких активність каталази знаходиться в межах 1,29-1,40 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпе-

роксидази в межах 35,81-36,15 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - в межах 33,80-36,00 УО/хв на 1 мг білка, вважають клінічно здоровими;

тварин, у яких активність каталази знаходиться в межах 1,18-1,28 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази - в межах 25,5-34,0 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - в межах 24,5-31,5 УО/хв на 1 мг білка, вважають частково ураженими впливом нітратів та нітритів, які потребують корекції системи антиоксидантного захисту організму шляхом застосування природних або синтетичних антиоксидантів, вітамінів;

тварин, у яких активність каталази є меншою 0,88 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази є меншою 20,0 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - меншою 19,0 УО/хв на 1 мг білка, вважають ураженими впливом високого рівня нітратів і нітритів у кормах з явищами незворотного порушення обміну речовин, що підлягають вибраковці.

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, зокрема ветеринарної токсикології, а саме до способів оцінки негативного впливу нітритів на організм свиней.

Заявлений спосіб може бути використаний у господарствах із різними формами власності, що вирощують і утримують свиней в умовах нітратного навантаження, тобто при підвищенні рівня нітратів і нітритів у кормах і воді.

Відомий спосіб оцінки негативного впливу нітратів на окремі органи і системи організму тварин, що базується на оцінці змін у функціонуванні процесів травлення і сечовиділення (Гуфрій Д.Ф. Зміни функцій шлунково-кишкового тракту у бугайців під впливом нітратів і нітритів // Матер. доп. Міжнарод. конф. присв. 110 роковинам заснування Львівського зоовет. Ін-ту, Львів, 1991. - С.13-14). Недоліком даного способу є те, що за допомогою його можна діагностувати негативний вплив нітратів на організм тільки при важкому ступені гострого перебігу нітратно-нітритного токсикозу.

Відомі також гематологічні способи виявлення негативного впливу нітратів на тваринний організм (Дмитров С., Джуров А., Антонов С. Диагностика отравлений животных. - М.: Агропромиздат, 1986. - 282 С. Мазуркевич А.И. Обмен нитратов и нитритов в организме животных. // Ветеринария.-1992. - № 1. - С. 54-55. Ключова Т., Башкова Л., Левченко О. Влияние на организм нитратов и нитритов при использовании их в пищевой промышленности и применение удобрений. // В кн.: Вопросы гигиены и охраны окружающей среды, М., 1979. - С.45. Полоз Д.Д., Сидоров Г. Нитраты и их отрицательное действие на организм животных // Тез. докл. науч. конф. "Экологические проблемы фармакологии и токсикологии", Казань, 1990. - С. 77-78. В.Б. Духрицкий, Г.А. Хмельницкий, Д.М. Вовк, Н.Ф. Панько // Проблема азотистого метаболизма: Тез. докл. Межреспубликанской науч.-практич. Конф. Волгоград.-1990. - С. 20-21.)

Способи включають оцінку реактивності організму при нітритно-нітратному навантаженні шляхом визначення деяких гематологічних та імуноло-

(13) U

(11) 65511

(19) UA

гічних показників у крові тварин (кількість гемоглобіну, метгемоглобіну, еритроцитів, лейкоцитів, аналіз лейкограм, концентрацію в крові нітратів і нітритів, загальний білок, сечовину, цукор, інсулін). Ці способи включають комплексний підхід до оцінки патології різних ступенів важкості, але оскільки нітрити проявляють подвійну дію, а, саме, метгемоглобіноутворюючу дію та утворення вільних радикалів, зазначенні показники гематологічних досліджень не дозволяють оцінити ступінь впливу нітритів на організм свиней.

Найбільш близьким по суті до способу, що заявляється, є спосіб визначення стану антиоксидантної системи при нітратному навантаженні: Гуфрий Д.Ф. Нитраты и активность ферментов // Тез. докл. науч. конф. Казан. Вет. ин-та. "Экологические проблемы фармакологии и токсикологии", Казань, 1990.- С. 25.

Спосіб полягає у визначенні в крові свиней при нітратно-нітритному навантаженні активності фермента каталази. За каталазою оцінюють стан системи антиоксидантного захисту організму свиней за нітратно-нітритного токсикозу. При цьому:

- тварини, у яких активність каталази знаходиться в межах 1,29-1,40 нмоль/хв на мг білка, вважають клінічно здоровими;

- тварини, у яких активність каталази знаходиться в межах 1,18-1,28 нмоль/хв на мг білка, вважають частково пораженими впливом нітратів та нітритів, які потребують корекції системи антиоксидантної антиоксидантного захисту організму;

- тварини, у яких активність каталази є меншою 0,88 нмоль/хв на мг білка, вважають пораженими впливом високого рівня нітратів та нітритів у кормах і з явищами незворотного порушення обміну речовин.

Недоліком даного способу є недостатня його точність, оскільки він не повністю відображає стан антиоксидантної системи крові свиней тому, що за одним показником важко судити про стан антиоксидантної системи організму при нітратно-нітритному токсикозі.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки і повністю відображає стан антиоксидантної системи крові свиней і забезпечує об'єктивну оцінку негативного впливу нітритів на організм свиней.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити ефективний і об'єктивний спосіб виявлення і оцінки ступеню негативного впливу нітратів і нітритів на організм свиней, зручний і доступний у застосуванні, економічно вигідний для господарств, у яких він застосовується.

Поставлена задача вирішується тим, що для оцінки стану системи антиоксидантного захисту за активністю ферментів крові додатково визначають ферментну активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і за комплексною картиною активності ферментів судять про ступінь негативного впливу нітратного навантаження на організм свиней, при цьому:

- тварини, у яких активність каталази знаходиться в межах 1,29-1,40 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази в межах 35,81-36,15 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисму-

тази - в межах 33,80-36,00 УО/хв. на 1 мг білка, вважають клінічно здоровими;

- тварини, у яких активність каталази знаходиться в межах 1,18-1,28 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази - в межах 25,5-34,0 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - в межах 24,5-31,5 УО/хв на 1 мг білка, вважають частково ураженими впливом нітратів та нітритів, які потребують корекції системи антиоксидантного захисту організму шляхом застосування природних або синтетичних антиоксидантів, вітамінів;

- тварини, у яких активність каталази є меншою 0,88 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази є меншою 20,0 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - меншою 19,0 УО/хв на 1 мг білка, вважають ураженими впливом високого рівня нітратів і нітритів у кормах і з явищами незворотного порушення обміну речовин, що підлягають вибраковці.

Технічний результат заявленого способу обумовлений впливом ферментів антиоксидантного захисту, яку вони відіграють в обміні речовин та зміною їх активності під впливом навантаження нітратами та нітритами.

Каталаза відновлює H_2O_2 до води. До активного центру ферменту входить тривалентне залізо, протопорфірин, який взаємодіє з перекисом водню за каталазним або по пероксидазним механізмом, в залежності від концентрації субстрату.

Глутатіонпероксидаза - каталізує розклад гідроперекисів ліпідів нерадикальним шляхом за допомогою глутатіону відновленого, а саме каталізує розпад перекису водню і окиснює глутатіон. Глутатіонпероксидаза разом з іншими антиоксидантами сприяє видаленню первинних продуктів частково редукованого кисню.

Супероксиддисмутаза - це ключовий фермент антирадикального захисту. Вона дисмутує супероксидрадикал до менш токсичного перекису водню. Залежно від мікроелементу, що знаходиться в активному центрі ферменту, виділяють Fe-, Zn-Cu- та Mn-залежні СОД. Метали виконують каталітичну функцію. Вони послідовно відновлюються і окиснюються в активному центрі ферменту. Fe-залежна СОД у більшій кількості знаходиться в еритроцитах, Zn-Cu-залежна - у цитоплазмі, а Mn-залежна - у мітохондріях.

Дія нітритів на організм тварин супроводжується утворенням в крові метгемоглобіну, де дво-валентне залізо гемоглобіну окиснюється до тривалентного. Процес окиснення гемоглобіну реалізується через взаємодію його оксиформи з нітрит-іоном по ланцюговому шляху. При окисненні гемоглобіну утворюється цілий ряд радикальних метаболітів, які є активними окисниками біологічних субстратів, надають виражену цитотоксичну дію, ініціюють процеси перекисного окиснення ліпідів. В процесі окиснення оксигемоглобіну активні форми кисню включаються як безпосередні учасники елементарних стадій, продуценти токсичного для організму перекису водню, також які приймають участь в реакціях окиснення оксигемоглобіну. Даному патологічному процесу запобігає багатокомпонентна система антиоксидантного захисту організму. Велику роль відіграє каталаза, глутаті-

нова система (глутатіонпероксидаза), супероксиддисмутаза.

Отже, зазначений нами спосіб забезпечує більш точну оцінку ступеню негативного впливу нітратів і нітритів на організм свиней.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином:

У тваринницьких господарствах в умовах нітратно-нітритного навантаження, одержуючи тривалий час корми з підвищеною кількістю нітратів для виявлення і оцінки ступеню негативного впливу нітратів і нітритів на організм свиней відбирають кров у тварин різних вікових груп. У крові визначають: каталазу (за методом Баха і Зубкової), глутатіонпероксидазу (за методом В.В. Лемешко і ін., Н. Siens), супероксиддисмутази (за методом Чеварі).

Аналіз одержаних результатів здійснюють наступним чином:

- тварини, у яких активність каталази знаходиться в межах 1,29-1,40 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази в межах 35,81-36,15 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - в межах 33,80-36,00 УО/хв. на 1 мг білка, вважають клінічно здоровими;

- тварини, у яких активність каталази знаходиться в межах 1,18-1,28 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази - в межах 25,5-34,0 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - в межах 24,5-31,5 УО/хв на 1 мг білка, вважають частково ураженими впливом нітратів та нітритів, які потребують корекції системи антиоксидантного захисту організму шляхом застосування природних або синтетичних антиоксидантів, вітамінів; - тварини, у яких активність каталази є меншою 0,88 нмоль/хв х мг білка, глутатіонпероксидази є меншою 20,0 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - меншою 19,0 УО/хв на 1 мг

білка, вважають пораженими впливом високого рівня нітратів і нітритів у кормах із явищами незворотного порушення обміну речовин, що підлягають вибраковці.

Приклад конкретного виконання

Ефективність заявленого способу та його переваги перед прототипом підтверджені прикладом конкретного виконання.

У господарстві ДП "Молочні ріки" ТзОВ "Правда" Буського району, Львівської області було відібрано 30 поросят великої білої породи тримісячного віку. Було створено 6 груп по 5 тварин у кожній. Тварини контрольної групи знаходились на звичайному раціоні, згідно з нормами ВІТА.

Тваринам дослідних груп створювали штучно нітратне навантаження, а саме:

Дослідна 1 - тваринам згодовували з комбікормом нітрат натрію у дозі 0,2 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла один раз на добу протягом місяця;

Дослідна 2 - тваринам згодовували з комбікормом нітрат натрію у дозі 0,3 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла один раз на добу протягом місяця;

Дослідна 3 - тваринам згодовували з комбікормом нітрат натрію у дозі 0,4 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла;

Дослідна 4 - тваринам згодовували з комбікормом нітрат натрію у дозі 0,5 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла;

Дослідна 5 - тваринам згодовували з комбікормом нітрат натрію у дозі 0,6 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла.

Кров для аналізу брали з краніальної порожнистої вени на 1,3, 6,9 годину після згодовування нітрату натрію.

Активність глутатіонпероксидази визначали за методикою В.В. Лемешко і ін., активність супероксиддисмутази визначали за методом Чеварі, активність каталази - за методикою Баха і Зубкової.

Основні показники активності ферментів як дослідних так і контрольної груп подані у таблицях 1 і 2.

Таблиця 1

Активність ферментів контрольної групи

Активність ферментів	Одиниці виміру	
Глутатіонпероксидаза	35,0±1,4	нмоль/хв на мг білка
Супероксиддисмутаза	34,48±1,2	УО/хв на 1 мг білка
Каталаза	1,35±0,08	нмоль/хв на мг білка

При цьому за прототипом у тварин всіх груп визначали активність каталази. Так, у тварин контрольної групи активність каталази була в межах 1,29-1,40 нмоль/хв на мг білка. При згодовуванні нітрату натрію у різних дозах активність каталази почала знижуватись, а саме при згодовуванні нітрату натрію у дозах 0,2 і 0,3 $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла активність каталази коливалася у межах 1,18-1,28 нмоль/хв на мг білка, при дозах 0,4-0,6 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла - у межах 0,70-1,05 нмоль/хв на мг білка.

На підставі даних активності каталази важко робити висновок про ступінь негативного впливу нітратів і нітритів на систему антиоксидантного захисту організму свиней.

При додатковому визначенні активності ферментів глутатіонпероксидази та супероксиддисмутази, ступінь негативного впливу нітратного навантаження на організм свиней проявляється більш повно. Так у тварин контрольної групи показники активності ферментів знаходилися в межах: глутатіонпероксидази 35,81-36,15 нмоль/хв на мг білка, супероксиддисмутази 33,80-36,00 УО/хв на 1 мг білка.

Згідно з даними таблиці у дослідних тварин, яким згодовували нітрат натрію у різних дозах, показники активності ферментів системи антиоксидантного захисту організму свиней мали певні відхилення. Так, із збільшенням дози нітрату натрію активність ферментів знижувалась.

У тварин, яким згодовували нітрат натрію у дозі 0,2 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, показники активності знаходилися у таких межах: глутатіонпероксидази 34,0-35,98 нмоль/хв на мг білка, супероксиддисмутази 29,68-34,48 УО/хв на 1 мг білка.

У тварин, яким згодовували нітрат натрію у дозі 0,3 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, показники активності знаходилися у таких межах: глутатіонпероксидази 25,4-34,81 нмоль/хв на мг білка, супероксиддисмутази 27,10-30,3 УО/хв на 1 мг білка.

У тварин, яким згодовували нітрат натрію у дозі 0,4 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, показники активності знаходилися у таких межах: глутатіонпероксидази 23,54-30,25 нмоль/хв на мг білка, супероксиддисмутази 20,48-29,45 УО/хв на 1 мг білка.

У тварин, яким згодовували нітрат натрію у дозі 0,5 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, показники активності знаходилися у таких межах: глутатіонпероксидази 19,9-28,98 нмоль/хв на мг білка, супероксиддисмутази 18,80-27,48 УО/хв на 1 мг білка.

У тварин, яким згодовували нітрат натрію у дозі 0,6 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла, показники активності знаходилися у таких межах: глутатіонпероксидази 19,3-27,87 нмоль/хв на мг білка, супероксиддисмутази 18,35-25,87 УО/хв на 1 мг білка.

Таким чином при активності ферментів крові: каталази, глутатіонпероксидази, супероксиддис-

мутази можна вважати, що тварини, які одержували з кормом нітрат натрію у дозах 0,2-0,3 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла - це тварини, у яких активність активності каталази знаходиться в межах 1,18-1,28 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази - в межах 25,5-34,0 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - в межах 24,5-31,5 УО/хв на 1 мг білка, вважають частково ураженими впливом нітратів та нітритів, які потребують корекції системи антиоксидантного захисту організму, застосуванням природних або синтетичних антиоксидантів, вітамінів. А тварини, які одержували з кормом нітрат натрію у дозах 0,4-0,6 г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$ маси тіла - це тварини, у яких активність каталази є меншою 0,88 нмоль/хв на мг білка, глутатіонпероксидази є меншою 20,0 нмоль/хв на мг білка, активність супероксиддисмутази - меншою 19,0 УО/хв на 1 мг білка, вважають ураженими впливом високого рівню нітратів і нітритів у кормах із явищами незворотного порушення обміну речовин.

Таблиця 2

Активність ферментів свиней за нітратного навантаження

Доза г $\text{NO}_3^-/\text{кг}$	Активність ферментів	Після введення препарату через (годин)			
		1	3	6	9
0,2	Глутатіонпероксидаза Супероксиддисмутаза Каталаза (прототип)	35,98±1,334,48±1,2 1,33±0,08	35,76±1,232,56±1,1 1,31±0,08	34,0±1,129,68±1,2 1,28±0,08	35,24±1,232,35±1,2 1,30±0,08
0,3	Глутатіонпероксидаза Супероксиддисмутаза Каталаза (прототип)	34,81±1,230,30±0,9 1,31±0,07	30,13±1,029,68±1,2 1,24±0,08	25,4±1,027,10±1,2 1,18±0,08	33,81±1,230,05±1,1 1,25±0,08
0,4	Глутатіонпероксидаза Супероксиддисмутаза Каталаза (прототип)	30,25±1,129,45±1,2 1,25±0,07	26,40±1,025,83±0,9 1,19±0,07	23,54±1,020,48±1,0 1,10±0,06	28,34±1,227,15±1,0 1,20±0,08
0,5	Глутатіонпероксидаза Супероксиддисмутаза Каталаза (прототип)	28,98±1,227,48±1,1 1,19±0,06	23,12±1,220,18±1,2 1,05±0,08	19,9±0,618,80±0,7 0,88±0,6	27,10±1,122,48±1,2 1,02±0,07
0,6	Глутатіонпероксидаза Супероксиддисмутаза Каталаза (прототип)	27,87±1,225,87±1,0 1,02±0,06	22,3 5±1,219,48±1,0 0,87±0,08	19,3±1,118,35±0,8 0,70±0,08	26,45±1,320,88±1,0 0,85±0,08

Отже, заявлений спосіб є точним і об'єктивним і дозволяє виявити ступінь негативного впливу нітратного навантаження на організм свиней.