



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58100 (13) A

(51) 7 G01N33/554, G01N33/567

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ АПРОБАЦІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН І ПІДБОРУ ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ КОРМОВИХ ДОБАВОК ДЛЯ ТВАРИН IN VITRO**

1

2

(21) 2002107818

(22) 02 10 2002

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл №7, 2003 р

(72) Кравців Роман Йосипович, Остапів Дмитро Дмитрович, Васерук Наталія Ярославівна, Паска Марія Зиновівна

(73) ЛЬВІВСЬКА ДЕРЖАВНА АКАДЕМІЯ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ІМ С З ГЖИЦЬКОГО

(57) 1 Спосіб апробації біологічно активних речовин і підбору оптимального складу кормових добавок для тварин in vitro, що базується на використанні біологічного тест-об'єкта, який відрізняється тим, що як біологічний тест-об'єкт використовують культуру клітин гранульозного шару фолікулів яєчника корів, яку культивують in

vitro у середовищі RPMI-1640, додаючи досліджувані біологічно активні компоненти кормових добавок у наростаючих дозах, при цьому ефективність і якість оцінюваних добавок визначають за інтенсивністю споживання кисню тест-об'єктом, а особливості впливу компонентів на окремі ланки генерації АТФ і реалізації кисню у ланках дихального ланцюга з'ясовують за допомогою внесення інгібіторів

2 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що як інгібітор термінальної ділянки (цитохромоксидази) використовують натрію азид ($5 \cdot 10^{-3} \text{M}$), а для дослідження вільнорадикального окиснення жирних кислот - натрію етилендіамінтетраацетат ($6 \cdot 10^{-4} \text{M}$)

Винахід відноситься до галузі кормовиробництва, зокрема до застосування біологічно активних речовин сільськогосподарським тваринам, а саме до способів оцінки дії біологічно активних добавок на внутрішньоклітинні процеси обміну речовин у тварин. Винахід може бути застосований в комбікормовій промисловості на підприємствах з різними формами власності при апробації виготовлених добавок до раціону для визначення оптимального їх складу і співвідношення компонентів.

Традиційні способи апробації кормових засобів (комбікормів, кормових добавок і преміксів), базуються на використанні лабораторних та с/г тварин (АС 1565468, 402176 1556626 328547). Проведення класичних досліджень на тваринах в цілому трудомістке і потребує численних та тривалих експериментів, витрати коштів. Крім цього, встановити оптимальний компонентний та кількісний склад кормових добавок та відслідкувати вплив поєднання біологічно активних речовин на обмінні процеси в організмі надзвичайно важко. Тому, виникла необхідність пошуку нових способів апробації добавок до раціонів сільськогосподарським тваринам з метою їх цілеспрямованого застосування, визначення оп-

тимальних доз та співвідношення компонентів у багатоскладових преміксах.

Знайдено технічне рішення (Кравців Р Й, Стадник А М, Остапів Д Д, Лозинська Г І. Окисно-відновні процеси в тканині найдовшого м'яза спини при нормалізації мікроелементного складу раціонів бичків - Львів, -2000 - Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини імені С З Гжицького - Т 2 - 4 4 - С 94-97). Автори використовували мітохондрії та мікосомально-цитозольну фракції тканини найдовшого м'яза спини бугайців, яким згодовували оцінюваний премікс, тобто апробація проводилася in vivo.

Недоліком відомого рішення є те, що спосіб не прогнозує ефективності використання біологічно активних речовин. Крім цього, після забою тварин дослідження проводились на органах, що не забезпечує виявлення процесів, зміни метаболізму у цілій клітині. За рахунок здатності мембран клітини диференційовано реагувати на подразники цілісна структура забезпечує захист органел від впливу факторів зовнішнього середовища.

Запропонований нами спосіб усуває недоліки прототипу та забезпечує високу чутливість до біологічно активних речовин і можливість оптимального підбору компонентного складу преміксів.

(13) A

(11) 58100

(19) UA

та кормових добавок

В основу винаходу покладено завдання розробити ефективний та зручний спосіб встановлення оптимальних кількостей та співвідношень біологічно активних речовин з метою цілеспрямованої корекції обміну речовин у тварин та підвищення продуктивності, доступний для використання у відгодівельних господарствах з різною формою власності

Технічний результат досягають шляхом використання біологічного тест-об'єкта - культури клітин гранульозного шару фолікулів яєчника корів, яку культивують у середовищі RPMI-1640 (Flow Laboratories) додаючи досліджувані біологічно-активні компоненти кормових добавок у наростаючих дозах, при цьому ефективність і якість оцінюваних добавок визначають за інтенсивністю споживання кисню тест-об'єктом, а особливості впливу оцінюваних компонентів на окремі ланки дихального ланцюга з'ясовують за допомогою внесення інгібіторів

Інтенсивність дихання клітин гранульозного шару фолікулів яєчника характеризує метаболічні процеси у клітині в присутності певних кількостей біологічно-активних речовин та їх поєднань і дозволяє здійснити оптимальний підбір кількісного і якісного складу компонентів кормових добавок

Для встановлення особливостей впливу біологічно активних речовин на окремі ланки генерації АТФ і немітохондріальні процеси, які зумовлюють споживання кисню, з метою диференціювання процесів синтезу енергії та розпаду структурних елементів, визначення змін біохімічного статусу та характеру метаболічних процесів, що відбуваються у клітині внаслідок дії біологічно активних речовин, використовували інгібітори термінальної ділянки дихального ланцюга (цитохромоксидази) - натрію азид (NaN_3 $5 \cdot 10^{-3}$ М), вільнорадикальне окислення жирних кислот інгібували NaEDTA $6 \cdot 10^{-4}$ М

Таким чином, заявлений спосіб забезпечує попередню оцінку ефективності застосування біологічно-активних речовин і дозволяє здійснити підбір оптимального складу та співвідношення компонентів кормових добавок, а також дозволяє заздалегідь визначити доцільність застосування тих чи інших біологічно-активних речовин і поєднати компоненти кормових добавок у найбільш ефективних співвідношеннях

При проведенні патентно-інформаційного пошуку авторами і заявником знайдено технічне рішення, яке містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим способом використання тест-об'єкту, за станом обміну речовин якого судять про доцільність використання кормових добавок для сільськогосподарських тварин (Кравців Р. І., Стадник А. М., Остапів Д. Д., Лозинська Г. І. Окисно-відновні процеси в тканині найдовшого м'яза спини при нормалізації мікроелементного складу раціонів бичків - Львів, -2000 - Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького - Т. 2 - Ч. 4 - С. 94-97)

Однак, наявність зазначених, спільних з прототипом ознак, недостатня для одержання технічного результату, який забезпечує заявлений

спосіб. Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали з заявленим способом не виявлено. Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію винаходу "новизна".

Заявлений спосіб забезпечує досягнення технічного результату - використання у якості тест-об'єкта для апробації біологічно активних речовин і підбору оптимального складу кормових добавок для сільськогосподарських тварин культури клітин гранульозного шару фолікулів яєчника корів, яку культивують *in vitro* у середовищі RPMI-1640 (Flow Laboratories), додаючи біологічно активні компоненти кормових добавок у наростаючих дозах, при цьому ефективність і якість оцінюваних добавок визначають за інтенсивністю споживання кисню тест-об'єктом, а особливості впливу компонентів на окремі ланки генерації АТФ і реалізації кисню у ланках дихального ланцюга з'ясовують за допомогою внесення інгібіторів

Заявлене технічне рішення належить до галузі кормовиробництва, зокрема до виробництва біологічно активних кормових добавок для сільськогосподарських тварин, а саме до способів оцінки дії кормових добавок на внутрішньоклітинні процеси обміну речовин у тварин. Винахід може бути застосований у кормовиробничій промисловості на підприємствах з різними формами власності при апробації виготовлених добавок для вивчення їх оптимального складу і доцільності співвідношення компонентів

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином

1 У корів після забою, відбирають яєчники та шляхом аспірації фолікулів отримують суспензію клітин. Центрифугують (2000 об/хв), декантують, суспендують у фосфатно-солевому буфері

2 Одержану культуру клітин гранульозного шару фолікулів яєчника корів інкубують *in vitro* 10-12 годин у середовищі RPMI-1640 (Flow Laboratories)

3 До середовища інкубації додають наростаючі дози біологічно активних речовин, які передбачається ввести в кормову добавку для тварин

4 Визначають інтенсивність дихання тест-об'єкта полярографічне (нл/О/мл суспензії клітин за хвилину) у термостатованій кюветі кюветі ($t = 38^\circ\text{C}$) з автоматичною реєстрацією перебігу процесу

5 Для встановлення особливостей впливу біологічно активних речовин на окремі ланки генерації АТФ і вільно радикального окислення жирних кислот до середовища інкубації додають інгібітори термінальної ділянки дихального ланцюга (цитохромоксидази) - натрію азид ($5 \cdot 10^{-3}$ М), вільнорадикального окислення жирних кислот - NaEDTA ($6 \cdot 10^{-4}$ М)

6 Аналізуючи одержані дані спостерігають за інтенсивністю дихання тест-об'єкту, визначають оптимальні дози біологічно активних речовин, які передбачається ввести в кормову добавку

7 Проводять поєднання біологічно активних компонентів додають у середовище інкубації гранульози і встановлюють склад багатокomпонентної кормової добавки

Вивчення зв'язків між інтенсивністю дихання клітин гранульози *in vitro* та внесенням у середовище інкубації біологічно активних речовин проводили в умовах лабораторії Львівської державної академії ветеринарної медицини кафедри ветеринарно-санітарної та радіологічної експертизи

Для цього у середовище визначення додавали мікроелементи у вигляді солей у дозах, відповідно до норми у сироватці крові (мкг/100мл сироватки, 2, 3) $FeSO_4-100$, $ZnSO_4-100$, $MnSO_4-5$, $CuSO_4-100$, $CoSO_4-0,4$, $KJ-3,9$, на половину нижчі та у п'ять - і десятикратно вищих кількостях, порівняно з оптимальною Крім цього, виготовлено премікс з досліджуваних солей мікроелементів, який також вносили у середовище визначення половина норми, в 2 рази вище від норми в сироватці крові

Апробовано метіонін (0,01 та 0,05мкг/мл), цистеїн (0,2мкг/мл), метіонати марганцю 0,05, міді 0,05, кобальту 0,03, цинку 0,05мкг/мл та цистеїнати заліза 0,02, міді 0,02, марганцю 0,02, кобальту 0,01мкг/мл Розроблено та апробовано премікс №1 (метіонат марганцю 0,05, метіонат міді 0,05, метіонат кобальту 0,03мкг/мл), премікс №2 (метіонат марганцю 0,05, метіонат міді 0,05, метіонат кобальту 0,03, метіонат цинку 0,05мкг/мл), премікс №3 (метіонат марганцю 0,05, метіонат міді 0,05, метіонат кобальту 0,03, метіонат цинку 0,05, метіонат заліза 0,025мкг/мл), премікс №4 (цистеїнат заліза 0,02, цистеїнат міді 0,02, цистеїнат кобальту 0,01, цистеїнат марганцю 0,0 мкг/мл), премікс №5 ($FeSO_4-0,05$, $CuSO_4-0,05$, $MnSO_4-0,05$, $CoSO_4-0,03$, цистеїн-0,02мкг/мл), премікс №6 ($FeSO_4-0,05$, $CuSO_4-0,05$, $MnSO_4-0,05$, $CoSO_4-0,03$, мкг/мл)

Перевірено *in vivo* (на бугайцях чорно рябої породи) ефективність заявленого способу Для цього апробовані *in vitro* біологічно активні речовини та багатокомпонентні премікси згодували тваринам протягом 90 днів Після чого визначали фізіологічний статус бугайців та оцінювали продуктивність тварин

Вивченням зв'язків між пропорційно зростаючими дозами мікроелементів у середовищі визначення та інтенсивністю дихання клітин гранульози *in vitro* встановлено особливості впливу окремих мікроелементів і їх преміксу При цьому, нормалізація вмісту всіх без виключення мікроелементів у середовищі визначення стимулювала на 2,4-24,4% дихальну активність клітин При збільшенні дози в п'ять і більше разів норми інтенсивність поглинання кисню відрізнялася

підвищення вмісту заліза мало стимулюючу дію, яка при десятикратній дозі досягала максимального значення ($36,7 \pm 6,28$ нг-атом $O/O,1$ мл суспензії клітин/хв), внесення цинку, та йоду у 5 та 10 кратних дозах не змінювало дихальної активності порівняно з величиною, встановленою при їх оптимальній кількості ($23,3-24,6$ нг-атом $O/O,1$ мл суспензії клітин/хв), збільшення міді та кобальту у середовищі визначення інгібувало споживання кисню, яке знижувалося на 2-3нг-атом $O/O,1$ мл суспензії клітин/хв $7,1-11,9\%$)

Додавання в середовище дослідження преміксу у половині від норми в сироватці крові підвищувало дихальну активність клітин з $28,8 \pm 1,73$ до $36,9 \pm 2,69$ нг-атом $O/O,1$ мл суспензії клітин/хв (28,1%) Наступне збільшення мікроелементів до норми сироватки крові ще стимулювало поглинання кисню на 21,4% Двократно вища доза суміші не підвищувала дихальну активність культури, яка була в межах значення, встановленого при нормі ($41,1 \pm 3,13$ нг-атом $O/O,1$ мл суспензії клітин/хв)

Таким чином, встановлено, що нормалізація вмісту мікроелементів в середовищі визначення стимулювала дихальну активність даної культури, а отже і генерацію АТФ Надлишок мікроелементів не однозначно впливав на інтенсивність поглинання кисню і залежав від ролі конкретного мікроелемента в обміні речовин На дихальну активність даної культури клітин суттєво впливали вміст йоду і селену ($\eta=0,37$), марганець ($\eta=0,32$), мідь ($\eta=0,22$) і кобальт ($\eta=0,38$)

Проведено апробацію ряду біологічно активних речовин амінокислот (метіоніну, цистеїну), солей мікроелементів, металоорганічних сполук мікроелементів з амінокислотами та багатокомпонентних преміксів (табл 1)

Дихання культури клітин гранульози, інкубованої 12 годин, становило $14,04 \pm 0,67$ нг-атом $O/O,1$ мл суспензії клітин за хвилину (контроль) Внаслідок внесення у середовище інкубації метіоніну у дозі 0,05мкг/мл дихальна активність культури практично не змінювалася, при збільшенні дози до 0,1мкг/мл зростала на 15,5% При додаванні цистеїну приріст споживання кисню склав 36,5%, метіонату марганцю-20,3%, метіонату міді-25,0 %, порівняно до контролю Метіонат цинку та метіонат кобальту знижували дихальну активність на 15-20%

Таблиця 1

Дихальна активність культури клітин гранульози за дії БАР (нг атом $O/O,1$ мл клітин/хв)

Умови досліджу	Доза досліджуваного чинника (мкг/мл)	Інтенсивність дихання (нг атом $O/O,1$ мл клітин/хв)
Контроль	-	$14,04 \pm 0,67$
метіонін	0,1	$16,22 \pm 0,47$
метіонін	0,05	$14,00 \pm 1,44$
цистеїн	0,2	$19,17 \pm 0,33$
метіонат марганцю	0,05	$16,89 \pm 0,98$
метіонат міді	0,05	$17,55 \pm 0,27$
метіонат цинку	0,05	$11,23 \pm 0,41$
метіонат кобальту	0,03	$11,93 \pm 0,85$

Продовження таблиці 1

Дихальна активність культури клітин гранулози за дії БАР (нг атом O/0,1мл клітин/хв)

Премікс №1 - метонат марганцю - метонат міді - метонат кобальту	0,05 0,05 0,03	18,71±0,43
Премікс №2 - метонат марганцю - метонат міді - метонат кобальту - метонат цинку	0,05 0,05 0,03 0,05	19,42±0,29
Премікс №3 - метонат марганцю - метонат міді - метонат кобальту - метонат цинку - метонат заліза	0,05 0,05 0,03 0,05 0,025	39,94±0,97
Премікс №4 - цистеінат заліза - цистеінат міді - цистеінат кобальту - цистеінат марганцю	0,02 0,02 0,02 0,01	21,09±0,58
Премікс №5 - FeSO ₄ - CuSO ₄ - MnSO ₄ - CoSO ₄ - цистеїн	0,05 0,05 0,05 0,03 0,2	18,12±0,58
Премікс №6 - FeSO ₄ - CuSO ₄ - MnSO ₄ - CoSO ₄	0,05 0,05 0,05 0,03	17,13±0,67

При додаванні метюватних преміксів №1 та №2 споживання кисню культурою клітин зростало на 333% та 383% відповідно. Найкращий результат отримано при додаванні до середовища інкубації культури п'ятискладового метонатного преміксу №3 - дихальна активність була вищою, ніж у контролі на 184,5%. Внесення неорганічних солей міді, кобальту, марганцю, заліза збільшувало інтенсивність поглинання кисню на 21,4%, додавання амінокислоти цистеїну разом з неорганічними солями змінювало дихальну активність, на 28,5% відносно контролю. Споживання кисню культурою клітин при внесенні чотирискладового цистеїнатного преміксу зростало на 50%, порівняно з контролем. Встановлені зміни дихальної активності культури клітин при дії різних форм мікроелементів та хелатних преміксів свідчать про їх здатність проникати у клітину і включатись в

метаболичні процеси, стимулювати споживання кисню та генерацію АТФ.

Таким чином, із апробованих добавок найбільш ефективними виявились премікси металоорганічних сполук біотичних елементів, а саме - метонатів у прописі метонат марганцю 0,05, метонат міді 0,05, метонат кобальту 0,03, метонат цинку 0,05, метонат заліза 0,025мкг/мл (премікс №3), та цистеїнатів у прописі цистеїнат заліза 0,02, цистеїнат міді 0,02, цистеїнат кобальту 0,01, цистеїнат марганцю 0,02мкг/мл (премікс №4). Встановлення особливостей впливу біологічно активних речовин на окремі ланки генерації АТФ і процесів, які зумовлюють споживання кисню при використанні інгібіторів окремих ланок дихального ланцюга показано на Фіг.

Проведено апробацію добавок *in vivo*. Підгодовівку проводили за схемою (табл 2)

Таблиця 2

Схема проведення дослідів

Групи	Кількість тварин у групі	Характер годівлі
Контрольна	10	основний раціон (ОР)
I дослідна	10	ОР+метонін 0,01мг/кг
II дослідна	10	ОР+цистеїн 0,02мг/кг
III дослідна	10	ОР+премікс №3 (FeSO ₄ 0,05+CuSO ₄ 0,05+MnSO ₄ 0,05+CoSO ₄ 0,03мг/кг ж/м)
IV дослідна	10	ОР+премікс №4 (метонат марганцю 0,05+метонат міді 0,05+метонат кобальту 0,03+метонат цинку 0,05+метонат заліза 0,025мг/кг ж/м)
V дослідна	10	ОР+премікс №4 (цистеїнат заліза 0,02, цистеїнат міді 0,02, цистеїнат кобальту 0,01, цистеїнат марганцю 0,02мг/кг ж/м)

Дослідженнями встановлено порівняно низьку ефективність застосування метопону та цистеїну, вищу сольового преміксу №5, а найкращий результат отримано при додаванні до раціону метю-

натного преміксу №3 та цистеїнатного №4 (табл 3) Отже, результат, отриманий *in vivo*, підтверджує дані експериментального матеріалу *in vitro*

Таблиця 3

Результати апробації добавок *in vivo*

Показник	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група	IV дослідна група	V дослідна група
Еритроцити, $10^{12}/л$	6,73±0,14	6,76±0,13	6,79±0,21	6,84±0,32	7,00±0,17	7,11±0,18
Гемоглобін, г/л	106,01±1,61	106,60±1,20	105,8±1,49	112,94±1,17	118,11±1,56	118,21±1,90
Загальний білок, г/л	80,0±0,89	82,8±0,90	83,1±0,99	83,2±0,60	84,9±0,42	84,0±0,67
АлАТ ммоль/год/л)	0,43±0,02	0,48±0,02	0,47±0,03	0,48±0,07	0,53±0,03	0,52±0,04
АсАТ ммоль/год/л)	1,00±0,09	1,14±0,02	0,86±0,03	0,88±0,04	1,27±0,07	1,12±0,07
Середньодо-бови прирости	648	713	727	746	819	798

Отже, спосіб забезпечує високу чутливість і відтворюваність, низьку вартість, швидке отримання результатів, надійність контролю за якістю проведення досліджень. Культура клітин гранульози не вимагає спеціальних обробок (трипсинізація, особливі умови підготовки та культивування), характеризується гліколізом та диханням

(характерно для метаболізму живих організмів) Отже, забезпечує максимально подібні умови метаболізму, властиві для організму тварин

Таким чином, отримані результати дозволяють прогнозувати вплив біологічно активних речовин на організм тварин і цілеспрямовано їх використовувати

