



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **38339** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
**G01N 1/28**  
**G01N 33/48**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ПОРУШЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ВІТАМІНУ В<sub>1</sub> НА ФУНКЦІОНУВАННЯ НЕРВОВО-М'ЯЗОВОГО СИНАПСУ**

1

(21) u200813356  
(22) 19.11.2008  
(24) 12.01.2009  
(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.  
(72) ШЕПЕЛЕВ СЕРГІЙ ЄВГЕНОВИЧ, UA, РОМАНЕНКО ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, UA  
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, UA  
(57) Спосіб визначення впливу порушення метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-

2

м'язового синапсу, що здійснюють шляхом уведення піддослідним тваринам антагоніста вітаміну В<sub>1</sub> - піритіаміну, який **відрізняється** тим, що проводять реєстрацію показників спонтанної та викликанної секреції медіатора з нервових закінчень діафрагми і за їхніми відхиленнями від норми визначають вплив порушення метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу.

Корисна модель, що заявляється, належить до фундаментальної медицини, а саме до експериментальної фізіології, і може бути використана для дослідження процесів, що відбуваються у нервово-м'язовому синапсі за умов експериментально створеного порушення метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> (тіаміну).

Понижений рівень забезпеченості вітаміном В<sub>1</sub> останнім часом виявлено у різних груп населення як України, так і інших країн. Це заслуговує на особливу увагу у зв'язку з участю вітаміну В<sub>1</sub> у забезпеченні функціональної активності нервової, опорно-рухової, серцево-судинної систем, підтриманні моторики шлунково-кишкового тракту, і визначає актуальність досліджень, спрямованих на встановлення механізмів нейротропної дії вітаміну В<sub>1</sub> в організмі.

Дефіцит вітаміну В<sub>1</sub> в організмі супроводжується розвитком м'язової слабкості, а також іноді і втратою моторної функції кінцівок. При пониженої забезпеченості організму вітаміном В<sub>1</sub> за допомогою електрофізіологічних методів реєструється зменшення складних потенціалів дії скелетних м'язів [1]. При отруєнні ціанобактеріями внаслідок дії тіамінази, що в них утворюється, зареєстровані випадки паралічу дихальної мускулатури [2]. З порушенням метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> у діафрагмальному нерві пов'язують випадки раптової смерті немовлят [3]. На здатність вітаміну В<sub>1</sub> впливати на міжклітинну комунікацію вказують дані про послаблення синтезу ацетилхоліну при дефіциті вітаміну В<sub>1</sub> [4] та можливість корегувати розлади, що виникають в цьому випадку, введенням піддослідним тваринам фізостигміну [5, 6]. Ці дані дозволяють

припустити, що порушення метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> супроводжується змінами стану синаптичної передачі у нервово-м'язових синапсах посмугованих м'язів, де медіатором є ацетилхолін.

Для моделювання тіамін-дефіцитних станів в експериментальній вітамінології широко використовуються антагоністи вітаміну В<sub>1</sub>, зокрема піритіамін. В структурі молекули піритіаміна, у порівнянні з тіаміном, атом сірки тiazолового кільця заміщений на вінілову групу. Поєднання аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub> з щоденними ін'єкціями піритіаміна широко використовується в експериментах з метою моделювання у тварин енцефалопатії Верніке [7].

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб дослідження нервово-м'язової передачі у мишей за умов попереднього уведення їм піритіаміну [8], який полягає у електроміографічному дослідженні нервово-м'язової передачі у тварин, яким внутрішньоочеревинно вводився піритіамін в дозі 50-100мг/кг ваги.

Однак, даний спосіб має недоліки, оскільки не дає безпосередньої інформації про перебіг синаптичних процесів.

Задача, яка вирішується способом, що заявляється - цілеспрямоване дослідження стану синаптичної передачі у скелетних м'язах піддослідних тварин (мишей) за умов порушення метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> його антагоністом піритіаміном.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який передбачає уведення піддослідним тваринам антагоніста вітаміну В<sub>1</sub> піритіаміну, згідно корисної моделі проводять реєстрацію

(13) **U**(11) **38339**(19) **UA**

показників спонтанної та викликанної секреції медіатора з нервових закінчень діафрагми і за їхніми відхиленнями від норми визначають вплив дефіциту вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу.

Спосіб здійснюється наступним чином. Використовують молодих мишей-самців з вагою 26-28г. Кожну тварину розміщують в індивідуальній клітці при температурі 23±1°C. Тварин ділять на дві групи. Тваринам експериментальної групи внутрішньоочередово вводять піритіамін в дозі 100мг/кг ваги в 0,2мл 0,9% розчину NaCl. Тваринам контрольної групи внутрішньоочередово вводять 0,2мл 0,9% розчину NaCl. Досліди по вивченню спонтанної та викликанної секреції медіатора з нервових закінчень діафрагми проводять з використанням стандартної мікроелектродної техніки. В якості об'єкта досліджень використовують ізольовані френіко-гемідіафрагмальні препарати. Препарат монтують в плексигласовій ванночці, через яку з постійною швидкістю пропускають насичений карбогеном (95% O<sub>2</sub> та 5% CO<sub>2</sub>) розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl - 137,0; KCl - 5,0; NaHCO<sub>3</sub> - 11,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,0; глюкоза - 11,0. Досліди проводять при кімнатній температурі (20-21°C). М'язові скорочення блокують шляхом використання низького вмісту Ca<sup>2+</sup> та високого вмісту Mg<sup>2+</sup> в розчині Кребса. Для стандартизації досліджень таке співвідношення Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> повинно бути постійним у всіх дослідах, його підбирають в залежності від генетичних особливостей використовуваної лінії тварин таким чином, щоб отримати максимальну амплітуду потенціалів кінцевої пластинки (ПКП) при гарантованому блокуванні скорочень в препаратах, отриманих від тварин контрольної групи. Діафрагмальний нерв стимулюють надпороговими прямокутними стимулами електричного струму тривалістю 0,1мс, частота та інші параметри яких визначають задачами експерименту. За допомогою стандартних скляних мікроелектродів, заповнених 3М KCl, внутрішньоклітинно реєструють мембранний потенціал (МП) м'язових волокон, мініатюрні потенціали кінцевої пластинки (МПКП) та ПКП. Відведення потенціалів від кожної кінцевої пластинки здійснюють протягом 1хв. В кожному нервово-м'язовому препараті досліджують по декілька кінцевих пластинок. Якщо МП м'язового волокна є нижчим -60мВ або змінюється під час реєстрації показників більше ніж на 5мВ, дані виключають з подальших розрахунків. Реєстрацію потенціалів починають не раніше ніж за годину після завершення монтування препарату в ванночці та початку подавання розчину. Отримані показники усереднюють для кожної групи та порівнюють між собою.

Прикладом конкретного використання способу, що пропонується, є дослідження нервово-м'язової передачі через 1,5 години після введення піддослідним мишам піритіаміну (експериментальна гру-

па) та 0,9% розчину NaCl (контрольна група). Проведені спостереження показали, що середня амплітуда МПКП у міоневральних синапсах тварин, яким був уведений піритіамін, була на 16% меншою у порівнянні з контрольною групою. Зміни носили вірогідний характер (p<0,05). Середні амплітуда ПКП та квантовий склад (КС) ПКП, який розраховували як співвідношення середніх амплітуд ПКП і МПКП, теж були вірогідно (p<0,01) меншими порівняно з показниками контрольної групи відповідно на 53,4% та 48,9%.

Наведені дані свідчать про те, що піритіамін зменшує розмір кванта та КС ПКП.

Таким чином, запропонований спосіб дає можливість досліджувати в умовах експерименту стан синаптичної передачі в скелетних м'язах при дефіциті вітаміну В<sub>1</sub>, що дозволяє використовувати його для широкого впровадження при проведенні досліджень, спрямованих на поглиблення уявлень про функціонування нервово-м'язової передачі та шляхи реалізації біологічної активності вітаміну В<sub>1</sub> в організмі.

#### Література:

1. Koike H., Misn K., Hattori N., Ito S., Ichimura M., Ito H., Hirayama M., Nagamatsu M., Sasaki I., Sobue G. Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency. // J Neural. Neurosurg. Psychiatry. - 2001. - 71, N 3. - P.357-362.
2. Маляревская А.Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного евтрофирования водоемов. - К.: Наук. думка, 1979. - 256с.
3. Barker J.N., Jordan F., Hillman D.E., Barlow O. Phrenic thiamin and neuropathy in sudden infant death // Annals New York Acad. Sci. - 1982. - 378. - P.449-452.
4. Szutowicz A., Tomaszewicz M., Bielarczyk H. Disturbances of acetyl-CoA, energy and acetylcholine metabolism in some encephalopathies // Acta Neurobiol. Exp. (Wars.). - 1996. - 56, N 1. - P.323 - 339.
5. Gibson G.E., Ksiezak-Reding H., Sheu K.F.R., Mykytyn V., Blass J.P. Correlation of enzymatic, metabolic and behavioral deficits in thiamine deficits and its reversal // Neurochem. Res. - 1984. - 9. - P.803 - 814.
6. Nakagawasai O., Tadano T., Hozumi S., Tan-No K., Nijima F., Kisara K. Immunohistochemical estimation of brain choline acetyltransferase and somatostatin related to the impairment of avoidance learning induced by thiamine deficiency // Brain Res Bull. - 2000. - 52, N 3. - P. 189 - 196.
7. Troncoso C., Johnson M.V., Hess K.M., Griffin J.W., Price D.L. Model of Wernicke's encephalopathy // Arch.Neurol. - 1981. - 38, N 6. - P.350-354.
8. Романенко А.В., Зиновьева М.Л., Кокшарева Н.В. Электромиографическое исследование действия пириитамина в скелетной мышце мыши // Докл. АН УССР. Сер. Б. - 1989. - №11. - С.74-77.