



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **38285** (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 АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ ВІТАМІНУ В₁ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ НЕРВОВО-М'ЯЗОВОГО СИНАПСУ

1

(21) u200811660
(22) 30.09.2008
(24) 25.12.2008
(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.
(72) ШЕПЕЛЄВ СЕРГІЙ ЄВГЕНОВИЧ, UA, РОМАНЕНКО ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, UA
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, UA
(57) Спосіб визначення впливу аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-

2

м'язового синапсу шляхом створення тіаміндефіцитного стану, який **відрізняється** тим, що проводять реєстрацію показників спонтанної та викликанної секреції медіатора з нервових закінчень діафрагми і за їхніми відхиленнями від норми визначають вплив аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу.

Корисна модель, що заявляється, відноситься до області 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 аліментарного дефіциту вітаміну В₁ (тіаміну).

Вітамін В₁ відіграє виключно важливу роль у функціонуванні нервової, опорно-рухової, серцево-судинної систем, забезпеченні моторики шлунково-кишкового тракту. Знижена забезпеченість цим вітаміном різного ступеню виявлена в останні десятиріччя серед певних груп населення як України, так і країн ближнього та дальнього зарубіжжя. Тому актуальність дослідження механізмів реалізації нейротропних властивостей вітаміну В₁ не викликає сумнівів.

Однією з характерних ознак дефіциту вітаміну В₁ у людини є м'язова слабкість, а в ряді випадків - втрата моторної функції кінцівок. Електрофізіологічними методами при цьому виявляється зменшення складних потенціалів дії скелетних м'язів [1]. Описані випадки паралічу дихальної мускулатури під впливом тіамінази, фермента, що руйнує тіамін, при отруєнні токсинами ціанобактерій [2]. Припускається, що ряд випадків раптової смерті немовлят, пов'язаних з припиненням передачі моторного сигналу на діафрагму, викликані порушенням метаболізму вітаміна В₁ у діафрагмальному нерві [3]. З іншого боку, показано, що дефіцит вітаміну В₁ викликає послаблення синтезу ацетилхоліну [4], а розлади, що спостерігаються при не-

глибокому його дефіциті, можуть коректуватися шляхом введення піддослідним тваринам фізостигміну [5, 6]. Це дає підстави для пояснення ряду порушень, що мають місце при дефіциті вітаміну В₁ станом синаптичної передачі в холінергічних і, зокрема, в нервово-м'язових синапсах.

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб дослідження поведінкових реакцій мишей за умов експериментально створеного аліментарного дефіциту вітаміну В₁ [7], який полягає в утримуванні піддослідних тварин на штучному раціоні, позбавленому тіаміну, та подальшому дослідженні їхньої рухової активності та моторної координації з використанням форсованого плавального тесту. Однак, даний спосіб має недоліки, оскільки не дає безпосередньої інформації про функціонування окремих структур нервової системи, в тому числі і нервово-м'язових синапсів.

Задача, яка вирішується способом, що заявляється - цілеспрямоване дослідження стану синаптичної передачі у скелетних м'язах піддослідних тварин (мишей) за умов аліментарного дефіциту вітаміну В₁.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який передбачає створення тіаміндефіцитного стану, згідно корисної моделі проводять реєстрацію показників спонтанної та викликанної секреції медіатора з нервових закінчень діафрагми і за їхніми відхиленнями від норми визначають вплив аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу.

(13) **U**(11) **38285**(19) **UA**

Спосіб здійснюється наступним чином. Використовують молодих мишей-самців з початковою вагою 10-12г. Тварин ділять на три експериментальні групи. Для запобігання канібалізму та копрофагії кожну тварину розміщують в індивідуальній клітці з сітчастою підлогою при температурі $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Тварини контрольної групи отримують синтетичну тіамін-контрольну дієту, яка містить 67,6% вуглеводів, 18% білків, 8% ліпідів, вітаміни та мінеральні солі, без обмежень в кількості вжитої дієти. До складу синтетичної дієти входять казеїн, вільний від вітамінів - 18,00%, DL-метіонін - 0,3%, холін хлорид - 0,1%, целюлоза - 1,5%, сахароза - 67,6%, соняшникова олії рафінована - 8,00%, солева суміш - 4%, вітамінна суміш - 0,5%. Сольова суміш містить NaCl - 13,9325%; KH_2PO_4 - 38,8967%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5,7302%; CaCO_3 - 38,1442%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,6960%; KI - 0,0790%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,4453%; ZnCl_2 - 0,0259%; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0475%; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0022%. Вітамінна суміш містить (в мг/кг дієти): тіаміна гідрохлориду - 16мг; рибофлавіну - 8,0мг; нікотинової кислоти - 50,0мг; кальція пантотенату - 40,0мг; фолієвої кислоти - 2,0мг; пара-амінобензойної кислоти - 100,0мг; інозиту - 100,0мг; вітаміну B_{12} - 0,03мг; піридоксина гідрохлориду - 5,0мг; біотину - 0,4мг; менадіону - 5,0мг; аскорбінової кислоти - 200,0мг; сахарози - до 5,0г. Вітаміни А в кількості 20000МЕ/кг дієти, Д - 2000МЕ/кг дієти та Е - 100,0мг/кг дієти окремо розчиняють в олії перед додаванням останньої у раціон. Перед додаванням у харчовий раціон казеїн прогрівають при 140°C протягом 3 годин. Тварини контрольної групи з аліментарним обмеженням отримують таку ж синтетичну тіамін-контрольну дієту, як і тварини контрольної групи, однак добову кількість дієти, отримувану кожною твариною цієї групи, обмежують, виходячи з добових потреб в їжі у тварин тіамін-дефіцитної групи на ідентичних строках утримання. Такий підхід дозволяє чітко розрізнити власне наслідки дефіциту вітаміну B_1 від можливо-го впливу анорексії, що розвивається при нестачі в організмі цього вітаміну. Тварини тіамін-дефіцитної групи отримують без обмежень синтетичну тіамін-дефіцитну дієту, ідентичну попередній за складом та способом приготування, але до неї не включають тіамін. Досліди по вивченню спонтанної та викликанної секреції медіатора з нервових закінчень діафрагми тварин всіх експериментальних груп 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_2 та 5% CO_2) розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl - 137,0; KCl - 5,0; NaHCO_3 - 11,0; NaH_2PO_4 - 1,0; глюкоза - 11,0. Досліди проводять при кімнатній температурі ($20-21^\circ\text{C}$). М'язові скорочення блокують шляхом використання низького вмісту Ca^{2+} та високого вмісту Mg^{2+} в розчині Кребса. Для стандартизації досліджень таке співвідношення $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ повинно бути постійним у всіх дослідах, його підбирають в залежності від генетичних особливостей використовуваної лінії тварин таким чином, щоб отримати максимальну ампліту-

ду потенціалів кінцевої пластинки (ПКП) при гарантованому блокуванні скорочень в препаратах, отриманих від тварин тіамін-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 3 М 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. Реєстрації 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 на 10-й, 15-й та 20-й дні споживання піддослідними мишами відповідних синтетичних раціонів. Проведені спостереження показали, що вже на 10-й день перебування на дієті середні амплітуди МПКП і ПКП у міоневральних синапсах тварин тіамін-дефіцитної групи були вірогідно ($p < 0,01$) меншими відповідно на 37,39% і 29,89% у порівнянні з контрольною групою і на 29,41% і 26,29% у порівнянні з контрольною групою з аліментарним обмеженням, на 15-й день - на 65,25% і на 76,44% у порівнянні з показниками контрольної групи і на 62,73% і 73,53% - у порівнянні з показниками контрольної групи з аліментарним обмеженням, на 20-й день експерименту ці показники були меншими відповідно на 61,61% і 85,47% та на 51,14% і 84,57%. Вірогідні ($p < 0,01$) зміни квантового складу (КС) ПКП, який розраховували як співвідношення середніх амплітуд ПКП і МПКП, у тварин тіамін-дефіцитної групи були зареєстровані лише на 20-й день перебування на дієті. Даний показник був меншим на 69,27% порівняно з контрольною групою та на 72,22% - порівняно з контрольною групою з аліментарним обмеженням. Дефіцит тіаміну не викликав вірогідних відмінностей МП м'язових волокон і частоти МПКП. Наведені дані свідчать про те, в основі прогресивного зниження амплітуди ПКП по мірі розвитку аліментарного дефіциту вітаміну B_1 лежать два процеси: зменшення розміру кванта, що спостерігається вже на початкових стадіях розвитку тіамін-дефіцитного стану, та зменшення КС ПКП, яке проявляється на більш пізніх його етапах.

Таким чином, запропонований спосіб дає можливість досліджувати в умовах експерименту стан синаптичної передачі в скелетних м'язах при аліментарному дефіциті вітаміну B_1 , 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 B_1 в організмі.

Література

1. Koike H., Misu K., Hattori N., Ito S., Ichimura M., Ito H., Hirayama M., Nagamatsu M., Sasaki I., Sobue G. Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency. // J Neurol. 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. - 256 с.
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., Myktyyn V., Blass J. P. Correlation of enzymatic, metabolic and behavioural 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. Nakagawasai O., Tadano T., Hozumi S., Taniguchi R., Tan-No K., Esashi A., Nijima F., Kisara K. Characteristics of depressive behavior induced by feeding thiamine-deficient diet in mice // Life sci. - 2001. - 69, N 10. - P.1181-1191.