



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **39004** (13) **U**
(51) МПК (2009)
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 В₁ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ НЕРВОВО-М'ЯЗОВОГО СИНАПСУ

1

(21) u200813594
(22) 25.11.2008
(24) 26.01.2009
(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 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 В₁ на функціонування нервово-

2

м'язового синапсу, що здійснюють шляхом уведення піддослідним тваринам антагоніста вітаміну В₁ окситіаміну, який **відрізняється** тим, що проводять реєстрацію показників спонтанної та викликані секретії медіатора з нервових закінчень діафрагми і за їхніми відхиленнями від норми визначають вплив порушення метаболізму вітаміну В₁ 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 В₁ (тіаміну).

Вітамін В₁ (тіамін) відіграє виключно важливу роль в забезпеченні функціональної активності збудливих тканин. Причинами гострого авітамінозу В₁ з летальними наслідками можуть бути зловживання алкоголем, незбалансоване харчування, негломовна блювота вагітних, операції на шлунково-кишковому тракті, парентеральне харчування. Надзвичайно розповсюдженими, навіть серед населення економічно розвинених країн, є субклінічні форми дефіциту тіаміна. Тому актуальність дослідження механізмів реалізації нейротропних властивостей вітаміну В₁ не викликає сумнівів.

Одним з класичних симптомів дефіциту вітаміна В₁ у людини є м'язова слабкість та парези. Електрофізіологічними методами у хворих при цьому виявляється зменшення складних потенціалів дії скелетних м'язів [1]. При отруєнні ціанобактеріями внаслідок дії тіамінази, що в них утворюється, зареєстровані випадки параліча дихальної мускулатури [2]. Висловлюється припущення про зв'язок між випадками раптової смерті немовлят і порушенням метаболізму вітаміну В₁ в діафрагмальному нерві [3]. Дефіцит вітаміну В₁ призводить до послаблення синтезу ацетилхоліну в головному

мозку [4], а ряд розладів, що супроводжують тіамін-дефіцитний стан, можна послабити введенням піддослідним тваринам фізостипміну [5, 6]. Ці дані вказують на зв'язок між порушенням метаболізму вітаміну В₁ та станом синаптичної передачі у холінергічних, і, зокрема, у нервово-м'язових синапсах пошмугованих м'язів.

Для моделювання метаболічних порушень, що викликані дефіцитом вітаміну В₁ в організмі, в експериментальній вітамінології широко використовуються антагоністи вітаміну В₁ зокрема окситіамін. Окситіамін відрізняється від тіаміна наявністю в його структурі в 4'-положенні піридинового кільця гідроксилу замість NH₂-групи. Властивості окситіаміну як антагоніста вітаміну В₁ обумовлені перетворенням окситіаміну у клітині на окситіамін-дифосфат, який є конкурентним інгібітором тіамін-дифосфат-залежних ферментів [7].

Найбільш близькою за технічною суттю є модель "гострого окситіамінового авітамінозу" у мишей [8], у відповідності з якою тваринам підшкірно одноразово вводиться окситіамін в дозі 100-400мг/кг ваги з подальшим вивченням активності тіамін-дифосфат-залежних ферментів та ряду інших біохімічних показників.

Однак, даний спосіб має недоліки, оскільки не дає інформації про вплив викликаних окситіаміном метаболічних зрушень на функціонування нервово-м'язових синапсів.

Задача, яка вирішується способом, що заявляється - дослідження стану синаптичної передачі

(13) **U**(11) **39004**(19) **UA**

у скелетних м'язах піддослідних тварин (мишей) за умов порушення метаболізму вітаміну В₁ його антагоністом окситіаміном.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який передбачає введення піддослідним тваринам антагоніста вітаміну В₁ окситіаміну, згідно корисної моделі проводять реєстрацію показників спонтанної та викликанної секреції медіатора з нервових закінчень діафрагми і за їхніми відхиленнями від норми визначають вплив порушення метаболізму вітаміну В₁ 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 $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Тварин ділять на дві групи. Тваринам експериментальної групи підшкірно одноразово вводять окситіамін в дозі 100мг/кг ваги в 0,2мл 0,9% розчину NaCl. Ураховуючи різку кислотну реакцію розчину окситіаміну, після приготування його рН доводять до значення 7,3-7,4 шляхом додавання NaOH. Тваринам контрольної групи підшкірно одноразово 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 френікогемідіафрагмальні препарати. Препарат монтують в плексигласовій ванночці, через яку з постійною швидкістю пропускають насичений карбогеном (95% O₂ та 5% CO₂) розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl - 137,0; KCl - 5,0; NaHCO₃ - 11,0; NaH₂PO₄ - 1,0; глюкоза - 11,0. Досліди проводять при кімнатній температурі (20-21°C). М'язові скорочення блокують шляхом використання низького вмісту Ca²⁺ та високого вмісту Mg²⁺ в розчині Кребса. Для стандартизації досліджень таке співвідношення Ca²⁺/Mg²⁺ 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 прямолінійними 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 монтювання 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 3, 24 та 72 години після введення піддослідним мишам окситіаміну (експериментальна група) та 0,9% розчину NaCl (контрольна група). Проведені спостереження показали, що середня амплітуда МПКП у міоневральних синапсах тварин, яким був уведений окситіамін, не змінювалася у порівнянні з контрольною групою. Середня амплітуда ПКП в нервово-м'язових препаратах, отриманих від тварин через 3 години після введення їм окситіаміну в дозі 400мг/кг, була меншою у порівнянні з контрольним показником на 33,6%, квантовий склад (КС) ПКП, який розраховували як співвідношення середніх амплітуд ПКП і МПКП - на 29,4%. Зміни обох параметрів носили вірогідний характер ($p < 0,01$). Через 24 години після ін'єкції окситіаміну значення середньої амплітуди ПКП було нижчим за контрольне на 25,1%, КС ПКП - на 21,9%. Зміни вказаних параметрів також мали вірогідний характер ($p < 0,01$ та $p < 0,05$ відповідно). Через 72 години після ін'єкції середня амплітуда та КС ПКП вірогідно не відрізнялися від контрольних показників.

Наведені дані свідчать про те, що окситіамін в нервово-м'язових синапсах діафрагми миші зменшує амплітуду та КС ПКП.

Таким чином, запропонований спосіб дає можливість досліджувати в умовах експерименту стан синаптичної передачі в скелетних м'язах при порушенні метаболізму вітаміну В₁ 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 В₁ 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. - 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., Ksiazek-Reding H., Sheu K.F.R., Mykityn 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, N3. - P. 189-196.

7. Островский Ю.М. Активные центры и группировки в молекуле тиамин. - Мн.: Наука и техника, 1975. - 424с.

8. Горенштейн Б.И., Островский Ю.М., Грицен-

ко Э.А. К характеристике острого авитаминоза В₁, вызываемого анти метаболитам и тиамин // Вопр. мед. химии. - 1972. - XVII, вып. 1. - С.58-64.