



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39779 (13) A

(51) 7 G09B23/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГОСТРИХ ОТРУЄНЬ ШАПИНКОВИМИ ГРИБАМИ

(21) 97126243

(22) 25.12.1997

(24) 15.06.2001

(33) UA

(46) 15.06.2001, Бюл. № 5, 2001 р.

(72) Кузьменко Сюзанна Антонівна, Локай Борис
Анатолійович, Бойчук Богдан Романович(73) Тернопільська державна медична академія ім.
І.Я. Горбачевського(57) Спосіб моделювання гострих отруєнь шапинковими грибами, що включає інкубацію ізольованих клітин з токсинами шапинкових грибів і наступне вивчення цитонекробіотичних реакцій, який **відрізняється** тим, що як тест-об'єкт використовують клітини ізольованої крові ссавців.

Винахід відноситься до медицини, а саме - до токсикології, і може бути використаний в експериментальній медицині при вивченні патогенезу гострих отруєнь ксенобіотиками, зокрема - отрутою білої поганки, для діагностики отруєння на доклінічній стадії захворювання.

Відомий спосіб моделювання гострих отруєнь білою поганкою шляхом екстрагування токсичних компонентів та наступним визначенням цитонекробіотичних реакцій на них біологічного тест-об'єкту, наприклад, при субкон'юнктивальному введенні у кролика досліджуваного екстракту і розвитком протягом першої доби кон'юнктивіту з наступною атрофією тканини на місці введення [1].

Недоліком відомого способу є необхідність використання тварин, довготривалість, неможливість диференціації ефектів екзо- та ендотоксикації, що робить його недостатньо інформативним і технологічним.

Відомий спосіб моделювання отруєнь токсинами білої поганки шляхом інкубації ізольованих гепатоцитів з синтетичним токсином білої поганки фаллоїдином [2].

Недоліками відомого способу є травмування клітин під час їх виділення, необхідність створення штучного інкубаційного середовища, проведення інкубації не з нативною отрутою білої поганки, а з синтетичним аналогом одної з 15 відомих її складових.

В основу винаходу поставлене завдання вдосконалити спосіб моделювання гострих отруєнь шапинковими грибами на основі визначення цитонекробіотичних реакцій ізольованих клітин та токсинами шапинкових грибів, в якому шляхом інкубації екстракту токсичних компонентів грибів з клітинами крові ссавців досягають підвищення відтворюваності моделі й технологічності моделювання.

Поставлене завдання вирішується тим, що в спосіб моделювання гострих отруєнь шапинковими грибами шляхом інкубації ізольованих клітин з токсинами шапинкових грибів з наступним визначенням цитонекробіотичних реакцій, відповідно до винаходу, інкубують клітини ізольованої крові ссавців з екстрактом токсичних компонентів шапинкових грибів.

Приклад здійснення дослідів і отримання позитивного результату

Із 1,0 г свіжої білої поганки (або 0,1 г сухої) одержують екстракт таким чином: шматочок гриба поміщують в колбу зі зворотним холодильником, додають 10 мл метилового спирту і кип'ятять на пісочній бані 10-15 хв, фільтрують, фільтрат випаровують до одержання маслянистої краплі. Відсутність метилового спирту в робочому розчині підтверджують хроматографічним дослідженням. Випарований фільтрат розчиняють в 2 мл ізотонічного розчину хлористого натрію, додають 0,2 мл до 2 мл гепаринізованої (12 МО/мл) крові ссавців, інкубують при 37°C протягом 3 год. Через 3 год від початку інкубації кров фіксують в 2,5% розчині глютаральдегіду на фосфатному буфері і в 1% розчині тетраоксиду осмію при pH 7,2-7,4. Потім препарати дегідратують в спиртах зростаючої концентрації і заливають в ЕПОН-812. Ультратонкі зрізи, виконані на мікромомі УМТП-2, після контрастування в розчинах уранілацетату і цитрату свинцю, вивчають за допомогою електронного мікроскопу ЕМВ-100 ЛМ.

На мікрофото 1 показано мікропрепарат еритроцита крові людини, інкубований з отрутою білої поганки, $\times 8000$; на мікрофото 2 - мікропрепарат лейкоцита крові людини, інкубований з отрутою білої поганки, $\times 10000$; на мікрофото 3 мікропрепарат лімфоцита крові людини, інкубований з отрутою білої поганки, $\times 12000$.

(19) UA (11) 39779 (13) A

При патогістологічному дослідженні (мікрофото 1) виявили перерозподіл гемоглобіну, деструкцію цитоліми, розшарування мембран, вихід гемоглобіну за межі клітини, появу еритроцитарних тіней і уламків еритроцитів. Нейтрофільні лейкоцити (мікрофото 2) втрачають початкову структуру. Ядро сегментується, ядерні мембрани розшаровуються, частково руйнуються. Значно зменшується вміст гетерохроматину. Цитоплазма бідна оргanelами. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум і мітохондрії майже не диференціюються. Значно зменшується вміст первинних гранул, а вторинні розташовуються по периферії клітини. У лімфоцитах (мікрофото 3) першочергові зміни виникають у ядрі і мітохондріях. Змінюється форма ядра, розшарування і розриви ядерної оболонки, руйнується ядерце, знижується кількість гетерохроматину. Мітохондрії лімфоцитів зменшені, матрикс їх гомогенізований, мембрани розшаровані

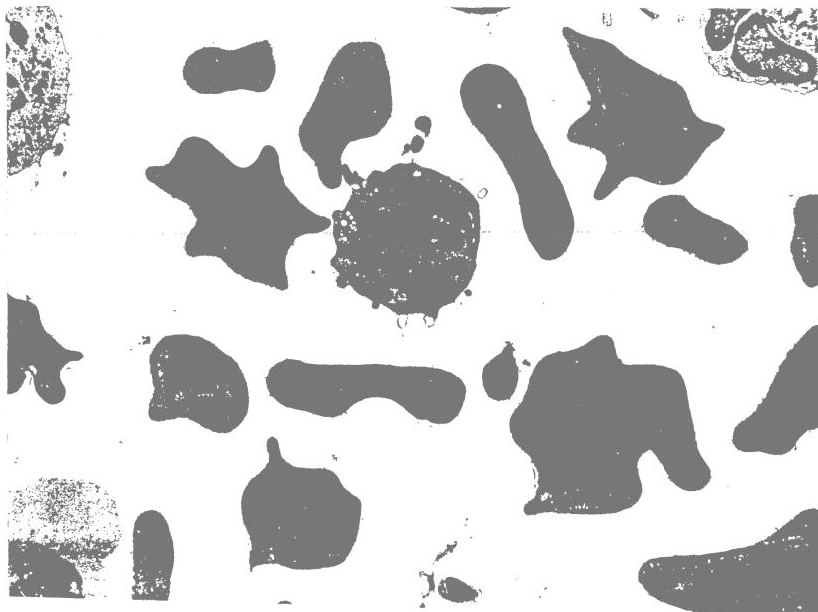
або зруйновані, кристи редуковані. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки поширені, частково фрагментовані, кількість фіксованих і вільних рибосом, а також полісом зменшена.

Запропонований спосіб моделювання гострих отруєнь шапинковими грибами, на відміну від прототипу, забезпечує такі переваги: заміну тварин на тканинну культуру ссавців; методичну доступність; простоту виконання, тобто технологічність; високий рівень відтворюваності саме екзоінтоксикації, без впливу факторів ендоінтоксикації.

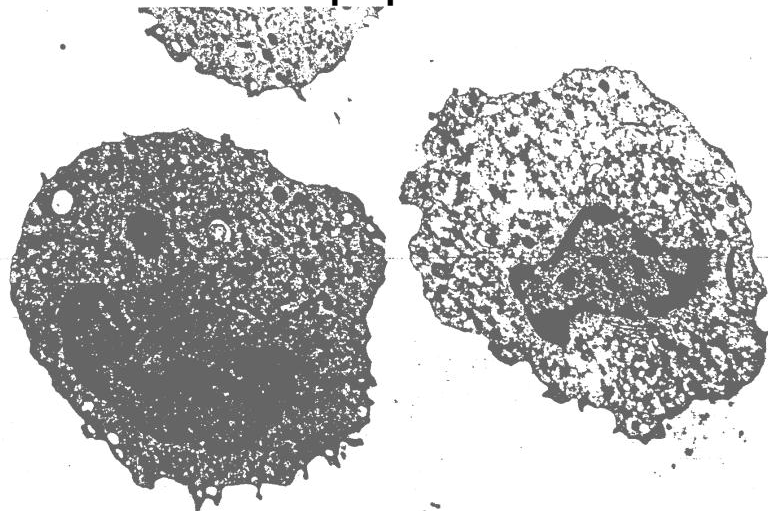
Джерела інформації

1. Авторське свідоцтво СРСР № 631816, G01 № 33/00. Способ определения токсичности Грибов / Н.И. Чучукало // Открытия. Изобрет. - 1978. - № 41. - С. 165.

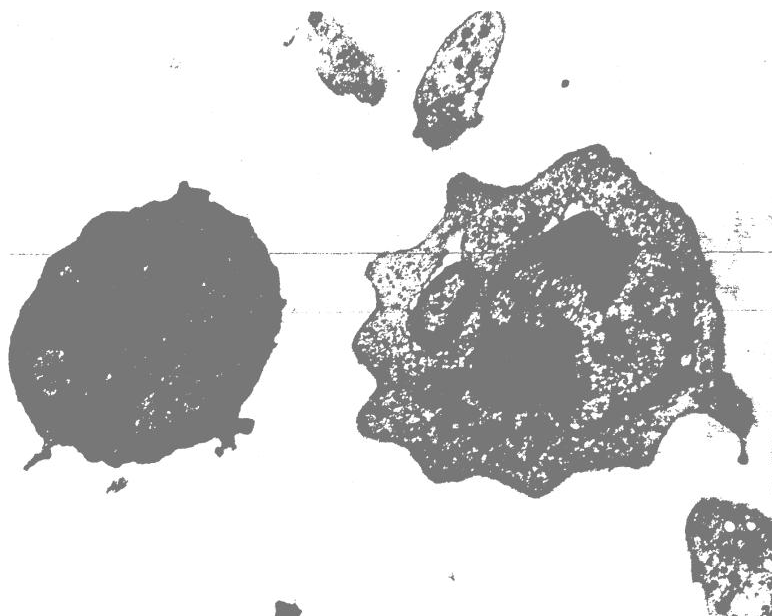
2. Gravela E., Poll G. Phalloidin poisoning of isolated hepatocytes: inhibition on protein synthesis // Experientia, 1977, v. 33, p. 603-604.



Мікрофото 1



Мікрофото 2



Мікрофото 3

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
