

Винахід стосується біології і медицини, зокрема експериментальної і клінічної токсикології, і може бути застосованим для дослідження патогенезу інтоксикації при отруєнні бідою поганкою, так і оцінки ефективності лікувальних заходів.

Відомий спосіб визначення цитотоксичної дії отрути бідої поганки, який включає інкубацію екстракту гриба бідої поганки і суспензії живих клітин як біологічного тест-об'єкту [1]. За відомим способом, з екстрактом токсину гриба бідої поганки на предметному склі інкубують одноклітинні організми, наприклад, інфузорії парамеції, а висновок про цитотоксичну дію отрути роблять за характером руху одноклітинних організмів у мікропрепараті та наступної деструкції клітин у вигляді цитолізу.

Недоліком відомого способу є недостатня інформативність, оскільки за анатомо-фізіологічними особливостями одноклітинні організми і клітини високоорганізованого багатоклітинного організму, зокрема вищих тварин і людини, в еволюційному плані відстоять надто далеко. З зазначених позицій рівень аргументованості висновків щодо токсичності отрути гриба, що досліджується, залишається недостатньо високим.

В основу винаходу поставлене завдання вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом введення в діагностичну тест-систему додаткового інгредієнта інкубаційної суміші, спрямованого на розширення інформативності діагностичної реакції, зокрема щодо напрямку змін біоенергетичних процесів на рівні ізольованих клітин, досягають підвищення точності і інформативності способу.

При розгляді технічного завдання було взято до уваги те, що токсини бідої поганки при поступленні в організм викликають комплекс цитотоксичних - структуральних і патохімічних змін на рівні клітин життєво важливих органів, наприклад, печінки і нирок, що водночас супроводжується суттєвими порушеннями метаболізму на рівні всього організму, ознаками якого вочевидь є згубні для організму вільнорадикальні процеси. Беручи до уваги наведене вище і актуальність розробки високоінформативних способів діагностики отруєння бідою поганкою на перший план виступає завдання якомога раннього визначення ступеню цитотоксичності токсинів бідої поганки. Цілком виправданим є пошук діагностичних проб на основі застосування адекватних біологічних тест-об'єктів, у тому числі на клітинному рівні. Такими є високодиференційовані багатфункціональні клітини крові, а саме - лейкоцити як клітини імункомпетентної системи, і які є визначальними у мобілізації типових реакцій захисту і пошкодження, організму, зокрема тих, що супроводжуються збуренням вільнорадикальних процесів. З іншого боку, важливою є здатність препаратів антиоксидантної дії блокувати вищевказані вільні радикали: прояв їх дії в інкубаційній суміші в реакції діагностичної системи слугуватиме підтвердженням наявності токсину в дослідному субстраті.

Виходячи з вищенаведеного, поставлене завдання вирішують тим, що у способі визначення цитотоксичної дії отрути бідої поганки, який включає інкубацію рівних об'ємів екстракту гриба бідої поганки і суспензії живих клітин як біологічного тест-об'єкту, відповідно до винаходу діагностичне дослідження ведуть одночасно в трьох препаратах - контрольному і двох дослідних, для чого на три окремих предметних скельця вміщують однаковий об'єм, наприклад, по 20-50мкл суспензії лейкоцитів лабораторної тварини, зокрема, білого щура, і до дослідних препаратів додають по аналогічному об'єму екстракту бідої поганки, а до одного з дослідних препаратів додатково вносять такий же об'єм 1% водного розчину препарату антиоксидантної дії тіотриазоліну, після чого до усіх препаратів на предметних скельцях додають розчин флюорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000, покривають їх скельцями, витримують при 18-22°C впродовж 3-4год і спостерігають у полі зору люмінесцентного мікроскопу, а висновок про рівень цитотоксичної дії екстракту бідої поганки роблять за характером реакції лейкоцитолізу і рівнем люмінесценції клітин у мікропрепаратах.

Перелік фігур креслень.

Фіг.1 (мікрофото). Люмінесцентне світіння лейкоцитів периферійної крові інтактних щурів (контроль). Акридин оранжевий (АО) у розведенні 1:10000. Об. 30хВИ; ок. x20K.

Фіг.2 (мікрофото). Реакція цитолізу лейкоцитів периферійної крові щурів під впливом екстракту бідої поганки (дослід 1). АО 1:10000. Об. 30хВИ; ок. x20K.

Фіг.3 (мікрофото). Реакція цитолізу лейкоцитів периферійної крові щурів під впливом екстракту бідої поганки (дослід 1). АО 1:10000. Об. 9х; ок. 7х. Основний контроль.

Фіг.4 (мікрофото). Характер люмінесценції лейкоцитів периферійної крові щурів під впливом екстракту бідої поганки при додаванні до інгредієнтів реакції препарату антиоксидантної дії тіотриазоліну (дослід 2). АО1:10000.Об.9х; ок. 7х.

Спосіб здійснюють таким чином. Готують контрольний і дослідні мікропрепарати, для чого на три окремих предметних скельцях вміщують рівні об'єми, наприклад, по 20-50мкл, суспензії лейкоцитів лабораторної тварини, зокрема, білого щура, і до лейкоцитів у двох дослідних препаратах вносять по аналогічному об'єму екстракту бідої поганки, а до одного з дослідних препаратів вносять такий же об'єм 1% водного розчину препарату антиоксидантної дії тіотриазоліну, після чого до усіх препаратів на предметних скельцях додають розчин флюорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000, покривають їх скельцями, витримують при 18-22°C впродовж 3-4год і спостерігають у полі зору люмінесцентного мікроскопу, а висновок про рівень цитотоксичної дії екстракту бідої поганки роблять за характером реакції лейкоцитолізу і рівнем люмінесценції клітин у мікропрепаратах.

Приклад 1

Готують контрольний і дослідні мікропрепарати, для чого на три окремих предметних скельцях внесли по 50мкл суспензії лейкоцитів крові щура, і до нанесеної суспензії в двох дослідних препаратах додали по 50мкл екстракту бідої поганки, а до одного з дослідних препаратів внесли 50мкл 1% водного розчину тіотриазоліну, після чого до усіх препаратів на предметних скельцях внесли по 50мкл розчину флюорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000, покрили їх скельцями, витримали при 20°C протягом 3год і спостерігали у полі зору люмінесцентного мікроскопу.

Цитотоксичний вплив екстракту бідої поганки на ізольовані лейкоцити проявився різко вираженою деструкцією клітин у вигляді цитолізу і каріореक्सису. Так, якщо в контрольному мікропрепараті (фіг.1) ядра лейкоцитів, переважно круглої форми лімфоцитів, люмінесціювали монохромним зеленим світлом, то в результаті інкубації клітин з екстрактом бідої поганки в мікропрепаратах (фіг.2, 3) помітні грубо денатуровані клітини у вигляді розмитих плям з характерним тьмяним зеленим і червоним світінням - наслідки токсичного цитолізу. При додаванні до суміші лейкоцитів з токсичним екстрактом бідої поганки препарату тіотриазоліну спостерігали пікове зростання яскравості люмінесцентного світіння значної кількості клітин у мікропрепараті (до

35-40% клітин), що є свідченням блокування індукованого грибним екстрактом вільно-радикального процесу в ізольованих клітинах (фіг.4). Останнє пов'язане з тим, що надлишок біохімічної енергії, що вивільнився в результаті сповільнення метаболічних процесів у клітинах антиоксидантом, забезпечує посилення люмінесценції біосубстрату, а саме нуклеїнових кислот лейкоцитів. Саме на це вказує виражений мембранопротекторний ефект тіотриазоліну, який, як видно з мікрофото на фіг.4, виражається гальмуванням цитотоксичної - лейкоцитолітичної дії грибною отрути. Таким чином, лейкоцитоліз під впливом екстракту білої поганки в I-му дослідному препараті в поєднанні з мембранопротекторним ефектом і піковим підвищенням яскравості люмінесценції клітинних ядер - у II-му дослідному препараті є свідченням наявності в екстракті білої поганки властивих цьому грибу токсичних чинників.

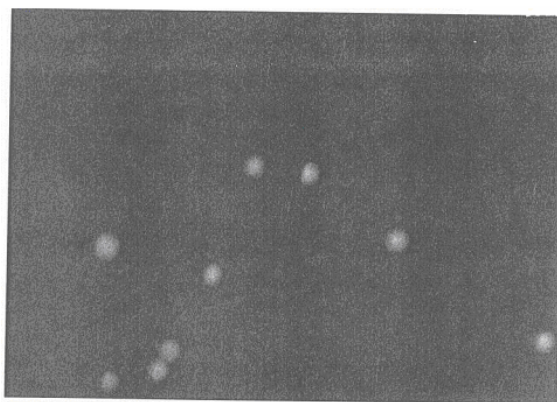
Приклад 2

Лейкоцитотоксична дія екстракту білої поганки у вигляді реакцій цитолізу і каріорексису за методикою вторинної (індукованої) люмінесценції виявлена при інкубації суспензії лейкоцитів, отриманих від різних тварин, зокрема, собаки, кролика, морської свинки, миші, кішки, голуба) і людини, що вказує на універсальний характер цитотоксичної дії грибних токсинів білої поганки. Аналогічна універсальність щодо лейкоцитів периферійної крові у вигляді мембранопротекторного ефекту і здатності до пікового посилення люмінесцентного світіння субстратів клітинних ядер притаманна також іншим препаратам антиоксидантної дії, зокрема, глутаргіну і гістидинату міді.

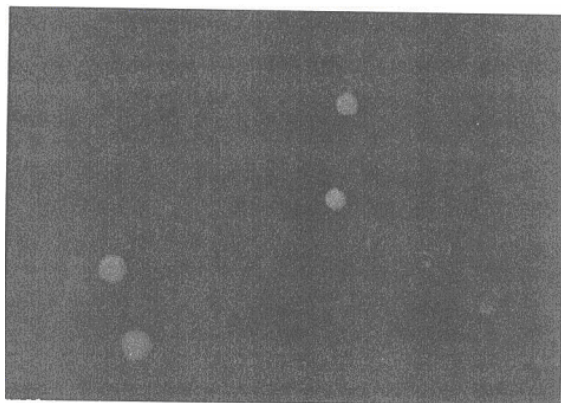
Отже запропонований спосіб забезпечує точніше та інформативніше, ніж за відомим способом-прототипом, визначення цитотоксичної дії токсину білої поганки в екстракті, і може знайти застосування в клінічній та експериментальній токсикології.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги

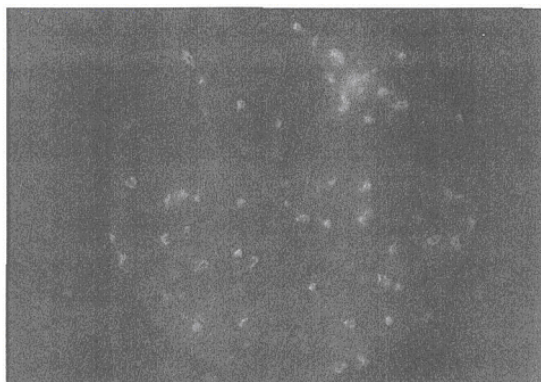
1. Патент №30016 А, Україна. Спосіб визначення отруйності грибів /Бойчук Б.Р. /Заявка №97125878, 08.12.97. Опубл. 15.11.00. Бюл. №6-11.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

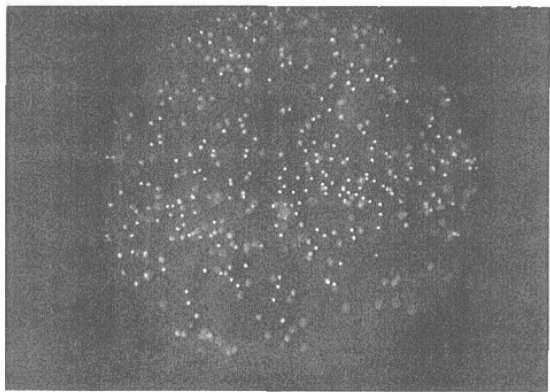


Fig. 4