



УКРАЇНА

(19) UA (11) 71842 (13) A

(51) 7 A61B10/00, A61K31/38, G09B23/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ОТРУТИ БІЛОЇ ПОГАНКИ

1

2

(21) 20031213140

(22) 30.12.2003

(24) 15.12.2004

(46) 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004 р.

(72) Дем'яненко Василь Васильович, Сопель Ольга Миколаївна, Мисула Юрій Ігорович, Фаринюк Володимир Устимович

(73) ТЕРНОПІЛЬСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ІМЕНІ І.Я.ГОРБАЧЕВСЬКОГО

(57) Спосіб визначення токсичної дії отрути білої поганки, який включає інкубацію екстракту отруйного гриба з біологічним тест-об'єктом і наступним дослідженням індукованих токсинами екстракту деструктивних змін, який відрізняється тим, що тест-об'єктом беруть поперечний зріз кореня рослини ферули (*Ferula*, L.) родини зонтичних, а діаг-

ностичне дослідження ведуть паралельно в трьох діагностичних пробах, для чого на три предметних скляних смужки наносять по відбитку поперечного зрізу кореня ферули, з яких один відбиток є контролем, а на два інших нашаровують по 20 мкл екстракту білої поганки, причому на один з них наносять додатково 20 мкл 1% розчину тіотриазоліну, після чого кожний з відбитків фарбують флуорохромним барвником, наприклад водним розчином акридину оранжевого в розведенні 1:10000, накривають скельцями, інкубують впродовж 30 хв. і спостерігають у полі зору люмінесцентного мікроскопа, а висновок про рівень токсичної дії екстракту білої поганки роблять за характером люмінесценції і деструкції кульок камеді соку ферули в мікропрепаратах.

Винахід стосується біології і медицини, зокрема експериментальної і клінічної токсикології, і може бути застосований як у дослідженні патогенезу інтоксикації при отруєнні білою поганкою, так і в оцінці ефективності лікувальних заходів.

Відомий спосіб визначення токсичної дії отрути білої поганки, який включає інкубацію екстракту отруйного гриба з біологічним тест-об'єктом і наступним дослідженням індукованих токсинами екстракту деструктивних змін [1]. При цьому з екстрактом токсину гриба білої поганки на предметному склі інкубують одноклітинні організми, наприклад, інфузорію парамецію, а висновок про токсичну дію отрути роблять за рівнем деструкції клітинних структур найпростіших у вигляді цитолізу.

Недоліком відомого способу є недостатня технологічність, яка пов'язана з необхідністю застосування культури організмів найпростіших, біофізіологічним особливостям яких притаманна значна біологічна варіабельність, що в свою чергу негативно впливає на рівень інформативності дослідження в цілому. До недоліків слід віднести високий рівень рухливості тест-об'єктів, а саме інфузорій у водному середовищі, що утруднює спостереження, реєстрацію, а отже – знижує точність результатів дослідження.

В основу винаходу поставлене завдання вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом застосу-

вання біологічного тест-об'єкта з сталими біологічними властивостями і нижчим рівнем структурної організації при збереженні високої чутливості до дії токсичних субстанцій екстракту білої поганки досягають підвищення технологічності, точності та інформативності способу.

При розгляді технічного завдання було взято до уваги те, що токсини білої поганки при контакті з чужорідним біологічним об'єктом здатні викликати в останньому комплекс універсальних за механізмами патохімічних змін, при тому, що прояв вказаних деструктивних явищ значною мірою визначається особливостями тест-об'єкту. До токсичночутливих об'єктів, здатних адекватно з високою чутливістю реагувати на дію токсичного чинника екстракту білої поганки слід віднести смолисті кульки соку кореня ферули - рослини з сімейства зонтичних [2, 3]. За отриманими нами даними, кулькам камеді соку ферули притаманна властивість поліхромної вторинної люмінесценції, а також здатність втрачати кулясту форму при дії деструктивного чинника, зливаючись у неправильної форми різні за розмірами плями, що також видно при люмінесцентній мікроскопії. Важливою є також властивість деяких антиоксидантів, наприклад, тіотриазоліну, стримувати токсичність компонентів екстракту білої поганки, що доцільно використовувати як додатковий критерій встановлення наявності токсичної дії субстрату отруйного гриба. 3

(13) A

(11) 71842

(19) UA

вказаних позицій інформація про реакцію на токсини білої поганки з боку біологічного тест-об'єкту неклітинної структури набуває особливого значення як у теоретичному, так і прикладному, перш за все, діагностичному аспекті.

Виходячи з вищенаведеного, поставлене завдання вирішують тим, що у способі визначення токсичної дії отрути білої поганки, який включає інкубацію екстракту отруйного гриба з біологічним тест-об'єктом і наступним дослідженням індукованих токсинами екстракту деструктивних змін, відповідно до винаходу тест-об'єктом беруть поперечний зріз кореня рослини ферули (*Ferula*, L.) родини зонтичних, а діагностичне дослідження ведуть паралельно в трьох діагностичних пробах, для чого на три предметних скляних смужки наносять по відбитку поперечного зрізу кореня ферули, з яких один відбиток є контролем, а на два інших нашаровують по 20 мкл екстракту білої поганки, причому на один з них наносять додатково 20 мкл 1% розчину тіотриазоліну, після чого кожний з відбитків фарбують флуорохромним барвником, наприклад водним розчином акридину оранжевого в розведенні 1:10000, накривають скельцями, інкубують впродовж 30 хв і спостерігають у полі зору люмінесцентного мікроскопу, а висновок про рівень токсичної дії екстракту білої поганки роблять за характером люмінесценції і деструкції кульок камеді соку ферули в мікропрепаратах.

Перелік фігур.

1. Зовнішній вигляд кореня ферули.
2. Вигляд кореня ферули на поперечному зрізі.
3. (Мікрофото). Люмінесцентне світіння кульок камеді соку ферули - контроль.
4. (Мікрофото). Характер люмінесценції і деформації кульок соку ферули в результаті токсичної дії екстракту токсину білої поганки
5. (Мікрофото). Ослаблення токсичної дії екстракту білої поганки на кульки соку ферули завдяки протекторному впливу тіотриазоліну.

Спосіб здійснюють таким чином. На трьох знежирених предметних скляних смужках роблять по відбитку свіжого поперечного зрізу кореня ферули, на два відбитки нашаровують по 20 мкл екстракту білої поганки, причому на один з них наносять додатково 20 мкл 1% розчину тіотриазоліну. На усі три відбитки додають по 20 мкл водного розчину флуорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000, накривають скельцями, інкубують впродовж 30 хв і спостерігають у полі зору люмінесцентного мікроскопу, а висновок про рівень токсичної дії отрути екстракту білої поганки роблять за характером люмінесценції і деструкції кульок соку ферули в мікропрепаратах.

Приклад. Вимитий і просушений корінь ферули (Фіг.1) розрізали поперек і, переконавшись у появі клейкого білого кольору соку на зрізі (Фіг.2), на трьох знежирених предметних скляних смужках зробили по відбитку. На два відбитки дослідних мікропрепаратів нанесли по 20 мкл екстракту білої поганки, після чого на один з них додатково нанесли 20 мкл 1% розчину тіотриазоліну. На усі відбитки, а саме два дослідні і контрольний, наша-

рували по 20 мкл водного розчину акридину оранжевого в розведенні 1:10000, покрили скельцями і після 30-хвилинної інкубації спостерігали в полі зору люмінесцентного мікроскопу. Звертали увагу на характер люмінесценції кульок камеді соку ферули у відбитку, форму кульок та їх деформацію під впливом інгредієнтів, а саме екстракту білої поганки та комбінації його з антиоксидантом (Фіг.3-5).

Як видно з мікрофото на Фіг.3, відбиток ферули в контрольному мікропрепараті представлений у вигляді великої кількості окремих кульок розмірами 1-15 мікрометрів з характерним яскравим світінням переважно жовто-зеленого кольору. При контакті відбитку з екстрактом токсину (Фіг.4) кульки камеді за час 30-хвилинної інкубації втрачали свою форму, зливаючись у великі (до ½ площі поля зору мікроскопу при малому збільшенні) аморфні плями, з множинними включеннями дрібних кульок, що вказує на виражену деструктивну дію токсичних субстанцій екстракту білої поганки. Одночасно мало місце зниження яскравості вказаних аморфних плям соку камеді від яскраво-жовтого до переважно темно-зеленого. Разом з тим з мікрофото на Фіг.5 видно, що при додатковому внесенні до суміші інгредієнтів на предметному склі – екстракту токсину з компонентами соку ферули препарату антиоксидної дії тіотриазоліну – токсична дія екстракту виявляється ослабленою: в мікропрепараті чітко визначаються не аморфні плями, а окремі кульки камеді ферули. Крім того, поодинокі агрегати характеризуються меншими, ніж у попередньому дослідному препараті (Фіг.4), розмірами. Важливим є також збереження високого рівня яскравості і спектрального складу люмінесцентного світіння кульок соку ферули при внесенні тіотриазоліну. Беручи до уваги те, що форма кульок камеді ферули підтримується високим рівнем енергії поверхневого натягу макромолекул смолистої субстанції, з очевидністю проступає специфічний енергетичне витратний механізм руйнівної здатності токсичних компонентів екстракту білої поганки, шляхи конкретної реалізації якої потребують подальшого поглибленого аналізу. З зазначених позицій запропонований спосіб започатковує новий перспективний шлях дослідження токсичної природи отрути білої поганки, що матиме не тільки теоретичне, але й прикладне значення.

Таким чином, запропонований спосіб забезпечує вищий, ніж за способом-прототипом, рівень технологічності, точності, а отже - інформативності діагностичного дослідження токсичної дії екстракту отруйного гриба білої поганки, і може бути застосований в токсикологічній науці і практиці.

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.
2. Коровин Е.П. Иллюстрированное монография рода *Ferula* (Toum.) L., Ташкент, 1947.
3. Коровин Е.П. Ферула-*Ferula* L., в кн.: Флора СССР, т. 17, М.-Л., 1951.

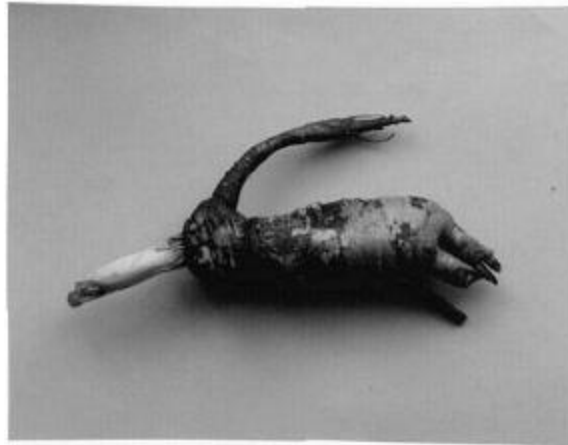


Fig. 1



Fig. 2

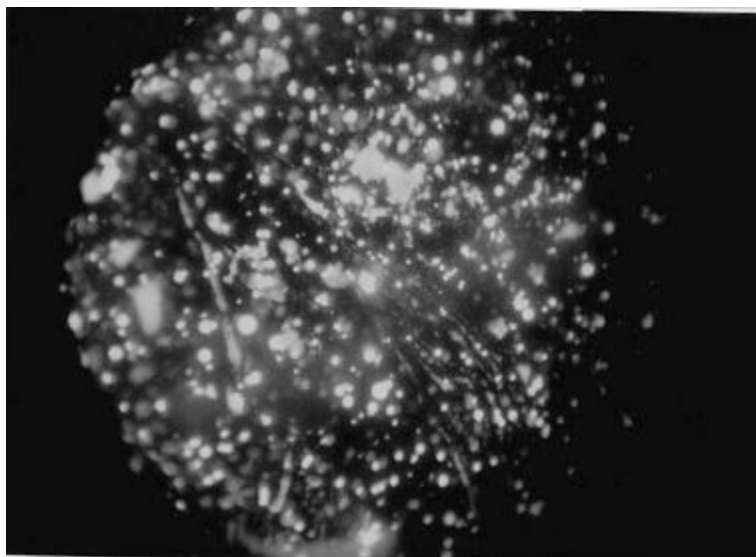


Fig. 3

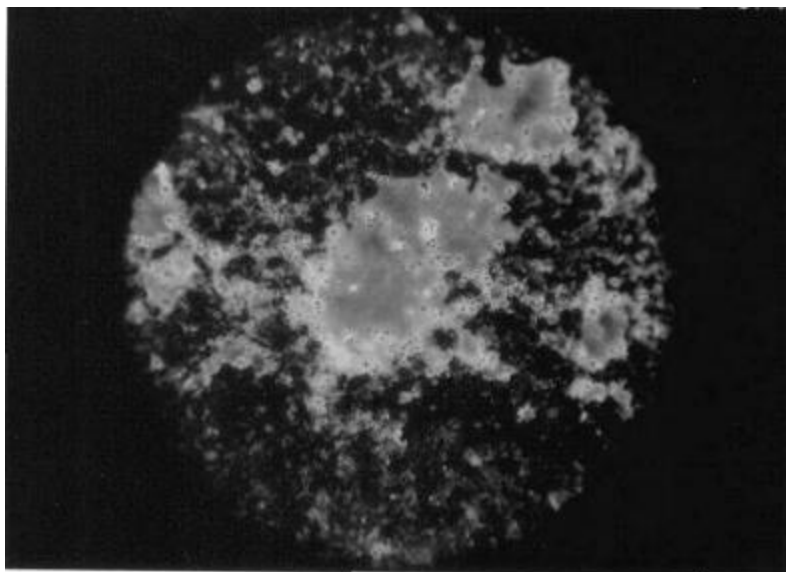


Fig. 4

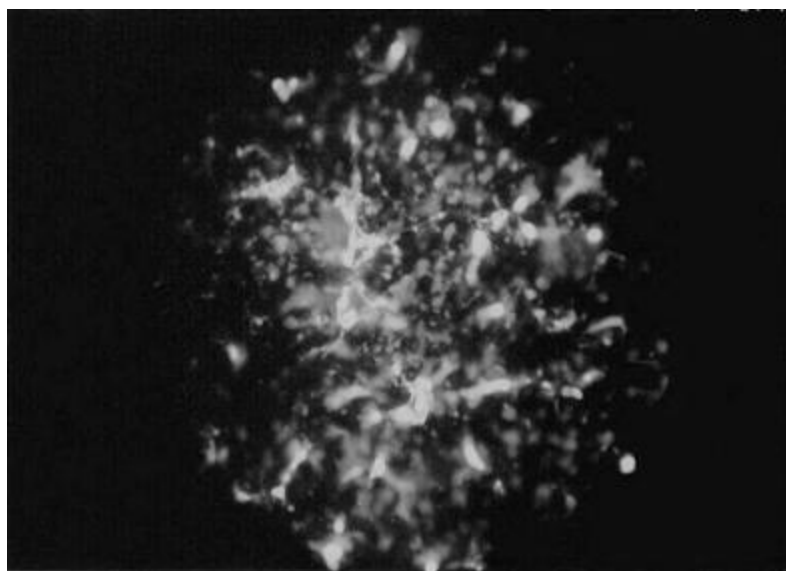


Fig. 5