



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 82167

(13) U

(51) МПК

A61B 5/0484 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 00708**

(22) Дата подання заявки: **21.01.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.07.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.07.2013, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

**Дзяк Георгій Вікторович (UA),
Дроздов Олексій Леонідович (UA),
Свіргун Ілля Степанович (UA),
Харапонова Олена Борисівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
"ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА
АКАДЕМІЯ МОЗ УКРАЇНИ",
вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ,
49044 (UA)**

(74) Представник:

**Білозуб Володимир Володимирович,
реєстр. №280**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ УТВОРЕННЯ ТИМЧАСОВОГО УМОВНОГО ЗВ'ЯЗКУ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В УМОВАХ РЕАКЦІЙ ПРОТЕОЛІЗУ

(57) Реферат:

Спосіб визначення утворення тимчасового умовного зв'язку головного мозку в умовах реакцій протеолізу включає формування умовної реакції, декапітацію, витяг головного мозку, відбір проб з його структур та визначення концентрацій лізосомних ферментів. Додатково відбирають проби фронтальної зони неокортексу, гіпокампа, медіальної частини таламуса, Варолієвого моста та смугастого тіла, підготовляють гомогенати з використанням трис-буферного розчину, в електрофотометричних умовах проводять обмінні реакції гомогенатів з 2-нафтиламід L-лейцином, за допомогою спектрофотометра й за гідролізом 2-нафтиламід L-лейцину визначають концентрації лізосомного цистеїнового катепсину Н, як показники рівнів вільної активності клітин. Формування умовної реакції здійснюють шляхом світлового та електрошокового впливів.

UA 82167 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до визначення вимірів або реєстрації з діагностичною метою, та може бути використаною в теоретичній та клінічній психології, нейрофізіології або в невропатології.

Відомий спосіб визначення активності мозку тварини, що включає формування умовної реакції пасивного уникнення, візуальну реєстрацію та хронометраж компонентів поведінки від початку навчання [1]. До причин, які перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату відносяться візуальний характер реєстрації та хронометраж компонентів поведінки. Це зумовлене відсутністю кількісних показників під час візуальної реєстрації компонентів поведінки та суб'єктивним характером хронометражу. Від цього сукупність використовуваних приймачів істотно впливає на достовірність кінцевого результату.

Більш висока вірогідність кінцевого результату притаманна способу визначення активності мозку, що включає навчання тварини, декапітацію, витяг головного мозку, відбір проб, визначення концентрацій глікопротеїну NCAM у пробах і реєстрацію змін клітинних контактів за кількістю його експресії [2]. Кількісне визначення експресії глікопротеїну NCAM відбиває залежність концентрації білка, відповідального за процеси структурного синоптичного ремоделювання та аксонального зростання, від характеру поведінки тварини [3], а за більш високою компетентністю показника дещо збільшується інформативність.

Більш наближеним до дійсної корисної моделі серед об'єктів аналогічного призначення за кількістю істотних ознак є спосіб визначення утворення тимчасового умовного зв'язку головного мозку в умовах реакцій протеолізу, що включає формування умовної реакції, декапітацію, витяг головного мозку, відбір проб з кори та гіпокампу головного мозку, визначення концентрацій кислоти фосфатази, РНКаз, катепсинів, як лізосомних ферментів до гемоглобіну, які характеризують активність клітин мозку [4]. Дослідження вільної активності чисельних лізосомних ферментів допускає збільшення інформативності, завдяки отриманню уявлень щодо рівня протеолізу катепсинів у корі й гіпокампі. Проте оцінка стану лише кори та гіпокампу, а також протеолітичної реакції до гемоглобіну стримує перевернення інформативності, з-поза відбиття сумарної активності вищезазначених лізосомних ферментів.

В основу корисної моделі поставлена задача винайти такий спосіб визначення утворення тимчасового умовного зв'язку головного мозку в умовах реакцій протеолізу, застосування котрого сприяло б збільшенню інформативності шляхом залучення більш компетентних структур у формуванні пам'яті.

Для досягнення вищезазначеного технічного результату у відомому способі визначення утворення тимчасового умовного зв'язку головного мозку в умовах реакцій протеолізу, що включає формування умовної реакції, декапітацію, витяг головного мозку, відбір проб з його структур та визначення концентрацій лізосомних ферментів, відповідно до корисної моделі, додатково відбирають проби фронтальної зони неокортексу, гіпокампа, медіальної частини таламуса, Варолієвого моста та смугастого тіла, підготовляють гомогенати з використанням трис-буферного розчину, в електрофотометричних умовах проводять обмінні реакції гомогенатів з 2-нафтиламід L-лейцином, за допомогою спектрофотометра й за гідролізом 2-нафтиламід L-лейцину визначають концентрації лізосомного цистеїнового катепсину Н, як показники рівнів вільної активності клітин, а формування умовної реакції здійснюють шляхом світлового та електрошокового впливів.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в наступному.

В основу корисної моделі поставлена задача яка надає реєстрацію слідів навчання за зміною проникності мембран лізосом після комбінаторного подразнення тварини світлом та електрошоком, яке прискорює формування умовної реакції. Оцінка вмісту лізосомного цистеїнового катепсину Н, як і протеолізу у фронтальній зоні неокортексу, гіпокампі, Варолієвому мості, медіальному таламусі та смугастому тілі відбиває зміни рівнів вільної активності катепсинів, як сліди формування нейрологічної пам'яті, та більш компетентно інформує про зміну рівнів проникності лізосомних мембран.

Поставлена задача вирішується тим, що полягає у визначенні рівня вільної активності лізосомного цистеїнового катепсину Н у фронтальній зоні неокортексу, гіпокампі, Варолієвому мості, медіальному таламусі, смугастому тілі, які приймають участь у формуванні енграм пам'яті, а під час протеолізу та модифікації білків відбивають рівні кількісних змін цистеїнового катепсину Н і проникності мембран лізосом, що збільшує інформативність. Кількісне визначення його вмісту дозволяє оцінити ступінь, тривалість тимчасово-умовних зв'язків головного мозку в умовах реакцій протеолізу. Зміни концентрації вільного катепсину Н інформують про перебіг реакцій лізосомних протеїназ у формуванні, кодуванні та відтворенні слідів нейрологічної пам'яті, здебільше, на молекулярних, надмолекулярних, субклітинних і міжклітинних рівнях.

Залучення 2-нафтиламід L-лейцину як протеолітичного ферменту, а також трис-буферного розчину націлене на каталіз реакції розщеплення лізосомного цистеїнового катеписину Н і якісну підготовку гомогенатів для визначення достовірної концентрації лізосомного цистеїнового катеписину Н, як показника рівнів вільної активності клітин.

Відомості, які підтверджують можливість відтворення корисної моделі полягають в наступному.

Для здійснення способу визначення утворення тимчасового умовного зв'язку головного мозку в умовах реакцій протеолізу залучають білих статевозрілих щурів, приміщення для їх подразнень, які складаються з великої освітленої та малої затемненої камер, з електрифікованими підлогами, що поєднані між собою круглим отвором. Для дослідження кількості катеписину Н застосовують трис-буферний розчин ("Sigma", USA), гідролізат 2-нафтиламід L-лейцину ("Koch-Light Laboratories", Англія) та спектрофотометр.

Суть способу визначення утворення тимчасового умовного зв'язку головного мозку в умовах реакцій протеолізу полягає у формуванні у тварини умовної реакції на світлове і електрошокове подразнення, декапітації, витягу головного мозку, з наступним визначенням концентрацій лізосомних ферментів. Для збільшення інформативності способу залучають більш компетентні структури головного мозку у формуванні пам'яті. Відбирають проби фронтальної зони неокортексу, гіпокампа, медіальної частини таламуса, Варолієвого моста та смугастого тіла. Гомогенати підготовляють з використанням трис-буферного розчину "Sigma" (USA). Обмінні реакції гомогенатів проводять в електрофотометричних умовах, використовуючи 2-нафтиламід L-лейцин виробництва "Koch-Light Laboratories" (Англія). За результатом гідролізу лізосомного цистеїнового катеписину Н визначають його концентрації за допомогою спектрофотометра, які оцінюють як показники рівнів вільної активності клітин.

Для перевірки інформативності способу був проведений експеримент (див. Табл.). Перед формуванням умовної реакції, щура розташовували в середині освітленої камери, хвостом до отвору, в темний відсік приміщення. Тварина вивчала освітлений відсік, знаходила отвір у темну камеру та переходила до неї. Латентний період такої реакції враховували як термін, від моменту розміщення щура в камері, до повного переходу у темну камеру. Через 15 с на підлогу камери подавали змінний імпульсний струм (тривалістю ~10 мс), інтенсивність стимуляції для кожного з щурів підбирали індивідуально, за порогом больової чутливості. Отвір між камерами залишали відчиненим. За щуром, який переміщувався до освітленої камери і намагався повернутися до темного приміщення спостерігали ~3 хв. Щурів, які повторно заходили до темної камери протягом ~3 хв, вилучали з експерименту. Через ~2 год., після вироблення пасивної оборонної навички, кожного з щурів піддавали електрошоковому впливу ($I=200$ мА, $t=500$ мс) для виклику амнезії та втрати умовної реакції. Протягом -72 год. спостерігали за поведінкою навчених щурів. Коли вони не відрізнялись від поведінки інтактних щурів, здійснювали перевірку збереження умовних реакцій. За результатами перевірки щурів розділяли на 2 групи: з амнезією, втратою навичок (30 %) та зі збереженням умовних реакцій (70 %). Після декапітації, у тварин вилучали головний мозок і виділяли фронтальну зону неокортексу, гіпокампа, Варолієв міст, медіальний таламус і смугасте тіло, які відбивають слід феномену пам'яті. Активність вільного катеписину Н, відповідно до корисної моделі, визначали у фронтальній зоні неокортексу, смугастому тілі, гіпокампі, медіальній частині таламуса та Варолієвому мості. Гомогенати (10 %) готували на 0,025 трис-буфері, послабленому Na-Cl (pH 7,40). Фактори активності досліджували електрофотометричним шляхом за гідролізом 2-нафтиламід L-лейцину.

Встановлено, що в різних структурах мозку у досліджуваних щурів при виробленні умовних реакцій відбувалися вірогідні зміни рівнів амінопептидазної активності катеписину Н як у щурів, які зберігали умовну навичку після електрошокового впливу, так і у амнезованих. Через ~72 год. спостерігали виражене посилення активності ферментів ($p<0,05$) у всіх структурах мозку щурів, які зберігали навички за істотними змінами у фронтальній корі, гіпокампі та Варолієвому мості, у 3,2, 2,8, 1,9 рази, відповідно.

Порівняння рівнів амінопептидазної активності цистеїнового катеписину Н у інтактних, навчених і амнезованих тварин (мкмоль-рНА/1 мг білка) інформувало про різноспрямований характер змін мозкових структур - збільшення активності у фронтальному неокортексі та Варолієвому мості у 2,5 і 1,9 рази та зниження її рівня у гіпокампі та смугастому тілі у 2,0 і 4,5 рази, відповідно.

Підвищення вільної активності катеписину Н інформує про збільшення проникності мембран лізосом мозку, а разом із цим про отримання інформації більш високого порядку. Запропонований спосіб визначення утворення тимчасового умовного зв'язку головного мозку в умовах реакцій протеолізу тварини є корисним при використанні в нейрофізіології, невропатології, теоретичній або клінічній психології, оскільки ґрунтується на залученні тих

структур головного мозку тварини, які відповідають за формування пам'ятного сліду більш компетентно та забезпечує здійснення наукових досліджень з високою достовірністю, при використанні меншої кількості лабораторних тварин.

Таким чином, запропоноване рішення задачі відповідає умові "промислова придатність", як таке, що може бути використаним з перевершенням вищенаведеного технічного результату за допомогою засобів, що стали відомі за подією пріоритету та поєднані з вирішенням поставленої задачі. Характеристика способу, що зазначена у Формулі, визначає відмінність його від об'єктів аналогічного призначення і допускає можливість набуття правового статусу як корисної моделі процесу.

Джерела інформації:

1. Буреш Я., Бурешова О. і Хьюстон П. Дж. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. - М.: Высшая школа, 1991.-236 с.

2. Дроздов О.Л., Лещинська І.О., Кошелев О.С, Чорна В.І. Вміст молекули клітинної адгезії NCAM в структурах головного мозку щурів при відтворенні умовної реакції пасивного уникнення //Neurophysiology.-1999. - Vol.131. - № 1. -С. 73-75.

3. Landmesser L. Synaptic plasticity: fastening synapses by adhesion // Curr. biol.-1997. - Vol. 628. - P. 286-292.

4. Дергачев В.В. Молекулярные и клеточные механизмы памяти. - М.: Медицина, 1977.-250 с.

Таблица

Експериментальні дані щодо оцінки формування УРПУ тварин
за вмістом цистеїнового катеписину Н в структурах головного мозку щурів

Лабораторні тварини	Кількість активності цистеїнового катеписину Н у досліджених структурах головного мозку, у мкмоль·рН·А на 1 мг білка				
	фронтальна кора	смугове тіло	гіпокамп	медіальний таламус	Варолієв міст
інтактні	0,102±0,01	0,253±0,025	0,153±0,014	0,251±0,025	0,123±0,02
навчені	0,313±0,028	0,333±0,038	0,425±0,039	0,285±0,027	0,236±0,021
амнезовані	0,263±0,025	0,126±0,011	0,105±0,01	0,235±0,021	0,236±0,021

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення утворення тимчасового умовного зв'язку головного мозку в умовах реакцій протеолізу, що включає формування умовної реакції, декапітацію, витяг головного мозку, відбір проб з його структур та визначення концентрацій лізосомних ферментів, який **відрізняється** тим, що додатково відбирають проби фронтальної зони неокортексу, гіпокампа, медіальної частини таламуса, Варолієвого моста та смугастого тіла, підготовляють гомогенати з використанням трис-буферного розчину, в електрофотометричних умовах проводять обмінні реакції гомогенатів з 2-нафтиламід L-лейцином, за допомогою спектрофотометра й за гідролізом 2-нафтиламід L-лейцину визначають концентрації лізосомного цистеїнового катеписину Н, як показники рівнів вільної активності клітин, а формування умовної реакції здійснюють шляхом світлового та електрошокового впливів.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601