



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97012** (13) **U**
(51) МПК
G01N 1/28 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 10476	(72) Винахідник(и): Романенко Олександр Вікторович (UA), Шепелев Сергей Євгенович (UA), Шепелев Євген Сергійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.09.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.02.2015	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2015, Бюл.№ 4	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ ВІТАМІНУ В₁ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ НЕРВОВО-М'ЯЗОВОГО СИНАПСУ

(57) Реферат:

Спосіб визначення впливу аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу шляхом створення тіамін-дефіцитного стану. Складають гістограми розподілу амплітуд викликаних електричною стимуляцією нерва потенціалів кінцевої пластинки. Проводять їх порівняння і за відхиленнями від норми визначають вплив аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу.

UA 97012 U

Корисна модель, що заявляється, належить до області фундаментальної медицини, а саме до експериментальної фізіології, і може бути використана для дослідження квантової секреції медіатора ацетилхоліну з нервових закінчень діафрагми миші при аліментарному дефіциті вітаміну В₁ (тіаміну) в організмі.

Вітамін В₁ відіграє виключно важливу роль у функціонуванні нервової, опорно-рухової, серцево-судинної систем, забезпеченні моторики шлунково-кишкового тракту. Знижена забезпеченість цим вітаміном різного ступеня виявлена в останні десятиріччя серед певних груп населення як України, так і країн ближнього та дальнього зарубіжжя. Тому актуальність дослідження механізмів реалізації нейротропних властивостей вітаміну В₁ не викликає сумнівів.

Однією з характерних ознак дефіциту вітаміну В₁ у людини є м'язова слабкість, а в ряді випадків - втрата моторної функції кінцівок.

Електрофізіологічними методами при цьому виявляється зменшення складних потенціалів дії скелетних м'язів [1]. Описані випадки паралічу дихальної мускулатури під впливом тіамінази, ферменту, що руйнує тіамін, при отруєнні токсинами ціанобактерій [2]. Припускається, що ряд випадків раптової смерті немовлят, пов'язаних з припиненням передачі моторного сигналу на діафрагму, викликані порушенням метаболізму вітаміну В₁ у діафрагмальному нерві [3]. З іншого боку, показано, що дефіцит вітаміну В₁ викликає послаблення синтезу ацетилхоліну [4], а розлади, що спостерігають ся при неглибокому його дефіциті, можуть коригуватися шляхом уведення піддослідним тваринам фізистигміну [5, 6]. Це дає підстави для пояснення ряду порушень, що мають місце при дефіциті вітаміну В₁, станом синаптичної передачі в холінергічних і, зокрема, в нервово-м'язових синапсах.

Найбільш близьким за технічною суттю до способу, що заявляється, є спосіб визначення впливу аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу [7], який полягає в утримуванні піддослідних тварин на штучному раціоні, позбавленому тіаміну, з подальшою реєстру цією показників спонтанної та викликанної подразненням нерва секреції медіатора з нервових закінчень ізольованої діафрагми. Однак, даний спосіб має недоліки, оскільки включає отримання усереднених показників, які не дають інформації про характер розподілу амплітуд викликаних електричною стимуляцією нерва потенціалів кінцевої пластинки в нормі та під впливом аліментарного дефіциту вітаміну В₁.

Задача, яка вирішується способом, що заявляється - дослідження характеру розподілу амплітуд викликаних електричною стимуляцією нерва потенціалів кінцевої пластинки у синапсах діафрагмального м'яза піддослідних тварин (мишей) за умов аліментарного дефіциту вітаміну В₁.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який включає створення тіамін-дефіцитного стану та обчислення середніх значень амплітуд викликаних електричною стимуляцією нерва потенціалів кінцевої пластинки, згідно з корисною моделлю, складають гістограми розподілу амплітуд потенціалів кінцевої пластинки, проводять їх порівняння і за відхиленнями від норми визначають вплив аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Використовують молодих мишей-самців з початковою вагою 10-12 г. Тварин ділять на три експериментальні групи. Для запобігання канібалізму та копрофагії кожну тварину розміщують в індивідуальній клітці з сітчастою підлогою при температурі 23±1 °С. Тварини контрольної групи отримують штучну тіамін-контрольну дієту, яка містить 67,6 % вуглеводів, 18 % білків, 8 % ліпідів, вітаміни та мінеральні солі, без обмежень в кількості вжитої дієти. До складу штучної дієти входять казеїн, вільний від вітамінів - 18,00 %, DL-метіонін - 0,3 %, холін хлорид - 0,1 %, целюлоза - 1,5 %, сахароза - 67,6 %, соняшникова олія рафінована - 8,00 %, сольова суміш - 4 %, вітамінна суміш 0,5 %. Сольова суміш містить NaCl - 13,9325 %; KH₂PO₄ - 38,8967 %; MgSO₄*7H₂O - 5,7302 %; CaCO₃ - 38,1442 %; FeSO₄*7H₂O - 2,6960 %; KI - 0,0790 %; MnSO₄*H₂O - 0,4453 %; ZnCl₂ - 0,0259 %; CuSO₄*5H₂O - 0,0475 %; CoCl₂*6H₂O - 0,0022 %. Вітамінна суміш містить (в мг/кг дієти): тіаміну гідрохлориду - 16 мг; рибофлавіну - 8,0 мг; нікотинової кислоти - 50,0 мг; кальцію пантотенату - 40,0 мг; фолієвої кислоти - 2,0 мг; пара-амінобензойної кислоти - 100,0 мг; інозиту - 100,0 мг; вітаміну В₁₂ - 0,03 мг; піридоксину гідрохлориду - 5,0 мг; біотину - 0,4 мг; менадіону - 5,0 мг; аскорбінової кислоти - 200,0 мг; сахарози - до 5,0 г. Вітаміни А в кількості 20000 МЕ/кг дієти, Д - 2000 МЕ/кг дієти та Е - 100,0 мг/кг дієти окремо розчиняють в олії перед додаванням останньої у раціон. Перед додаванням у харчовий раціон казеїн прогрівають при 140 °С протягом 3 годин. Тварини контрольної групи з аліментарним обмеженням отримують таку ж штучну тіамін-контрольну дієту, як і тварини контрольної групи, однак добову кількість дієти, отримувану кожною твариною цієї групи, обмежують, виходячи з добових потреб в їжі у тварин тіамін-дефіцитної групи на ідентичних строках утримання. Такий підхід дозволяє

чітко розрізнити власне наслідки дефіциту вітаміну B₁ від можливого впливу анорексії. Тварини тіамін-дефіцитної групи отримують без обмежень штучну тіамін-дефіцитну дієту, до складу якої не включають тіамін. Досліди по вивченню квантової секреції медіатора з нервових закінчень діафрагми проводять з використанням стандартної мікроелектродної техніки. Як об'єкт досліджень використовують ізольовані френіко-гемідіафрагмальні 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 згаданому розчині Кребса. Для стандартизації досліджень співвідношення Ca²⁺/Mg²⁺ повинно бути постійним у всіх дослідах, його підбирають таким чином, щоб отримати максимальну амплітуду викликаних електричною стимуляцією нерва потенціалів кінцевої пластинки (ПКП) при гарантованому блокуванні скорочень в препаратах, отриманих від тварин тіамін-контрольної групи. Діафрагмальний нерв стимулюють надпороговими прямолінійними стимулами електричного струму тривалістю 0,1 мс, частота та інші параметри яких визначають задачами експерименту. За допомогою стандартних скляних мікроелектродів, заповнених 3 М KCl, внутрішньоклітинно реєструють мембранний потенціал (МП) м'язових волокон, мініатюрні потенціали кінцевої пластинки (мПКП) та ПКП. Відведення потенціалів від зони кожної кінцевої пластинки здійснюють протягом 1 хв. В кожному нервово-м'язовому препараті досліджують по декілька кінцевих пластинок. Якщо МП м'язового волокна є нижчим - 60 мВ або змінюється під час реєстрації показників більше ніж на 5 мВ, дані виключають з подальших розрахунків. Реєстрацію потенціалів починають не раніше ніж за годину після початку суперфузії препарату розчином Кребса.

Для амплітуд ПКП, зареєстрованих в усіх досліджених синапсах кожної експериментальної групи, складають варіаційні ряди [8] з інтервалами, рівними 0,1 мВ [9], в діапазоні 0-5 мВ. З метою коректного співставлення варіаційних рядів частоти варіант виражають у відсотках [8]. На підставі отриманих варіаційних рядів будують гістограми розподілу амплітуд ПКП, які порівнюють між собою візуально.

Прикладом конкретного використання способу, що пропонується, є дослідження нервово-м'язової передачі в синапсах френіко-гемідіафрагмальних препаратів, отриманих від мишей контрольної групи з аліментарним обмеженням та тіамін-дефіцитної групи на 10-й, 15-й та 20-й дні споживання відповідних штучних раціонів. Гістограма розподілу амплітуд ПКП в синапсах френіко-гемідіафрагмальних препаратів, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи на 10-й день споживання дієти, характеризується зміщенням моди вліво порівняно з контролем за рахунок збільшення частки низько амплітудних ПКП. Кількість "нульових" реакцій, тобто таких, де у відповідь на пред'явлений стимул не виникали ПКП, практично не відрізняється від контролю (фіг. 1).

На фіг. 1 зазначені гістограми розподілу амплітуд потенціалів кінцевої пластинки в нервово-м'язових синапсах діафрагми миші на 10-й день споживання тваринами штучної дієти. На верхньому графіку – в препаратах, отриманих від тварин контрольної групи з аліментарним обмеженням (42 синапси, 7 препаратів), на нижньому – в препаратах, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи (41 синапс, 7 препаратів). З лівого боку окремо показана частота "нульових" реакцій.

Гістограма розподілу амплітуд ПКП в синапсах препаратів, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи на 15-й день експерименту, характеризується звуженням правої частини завдяки елімінації високо амплітудних ПКП при одночасному різкому збільшенні частки низько амплітудних сигналів, про що свідчить значне зміщення моди вліво. Кількість "нульових" реакцій збільшена порівняно з контролем (фіг. 2).

На фіг. 2 зазначені гістограми розподілу амплітуд потенціалів кінцевої пластинки в нервово-м'язових синапсах діафрагми миші на 15-й день споживання тваринами штучної дієти. На верхньому графіку – в препаратах, отриманих від тварин контрольної групи з аліментарним обмеженням (42 синапси, 7 препаратів), на нижньому – в препаратах, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи (41 синапс, 7 препаратів). З лівого боку окремо показана частота "нульових" реакцій.

Гістограма розподілу амплітуд ПКП в синапсах френіко-гемідіафрагмальних препаратів, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи на 20-й день споживання ними штучної дієти, характеризуються подальшим зміщенням моди вліво, що свідчить про наростання присутності низько амплітудних сигналів, та суттєвим збільшенням кількості "нульових" реакцій (фіг. 3).

На фіг. 3 зазначені гістограми розподілу амплітуд потенціалів кінцевої пластинки в нервово-м'язових синапсах діафрагми миші на 20-й день споживання тваринами штучної дієти. На

верхньому графіку – в препаратах, отриманих від тварин контрольної групи з аліментарним обмеженням (35 синапсів, 7 препаратів), на нижньому – в препаратах, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи (14 синапсів, 5 препаратів). З лівого боку окремо показана частота "нульових" реакцій.

5 При цьому середні значення амплітуди ПКП в синапсах френіко-гемідіафрагмальних препаратів, отриманих від тварин контрольної групи з аліментарним обмеженням та тіамін-дефіцитної групи, становили відповідно $1,75 \pm 0,13$ мВ та $1,29 \pm 0,11$ мВ на 10-й день, $1,70 \pm 0,12$ мВ та $0,45 \pm 0,05$ мВ на 15-й день, $1,62 \pm 0,14$ мВ та $0,25 \pm 0,08$ мВ - на 20-й день споживання відповідних раціонів.

10 Таким чином, запропонований спосіб дає можливість досліджувати в умовах експерименту стан синаптичної передачі в скелетних м'язах при аліментарному дефіциті 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.

15 Джерела інформації:

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, № 3. - P. 357-362.

20 2. Маляревская А.Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного евтрофирования водоемов. - К.: Наук, думка, 1979. - 256 с.

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, № 1. - P. 323-339.

5. Gibson G.E., Ksiezak-Reding H., Sheu K.F.R., Mykityn V., Blass J.P. Correlation of enzymatic, metabolic and behavioural 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, № 3. - P. 189-196.

7. Патент 38339 UA, МПК G01N 1/28, G01N 33/48. Спосіб визначення впливу порушення метаболізму вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу /Романенко О.В., Шепелев С.Є.; заявник та патентоутримувач Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця/- № u200813356; заявл. 19.11.2008; опубл. 12.01.2009.

8. Лакин Г.Ф. Биометрия /Г.Ф. Лакин. - М.: Изд-во "Высшая школа", 1980. - 293 с.

9. Скок В.И. Нервно-мышечная физиология /В.И. Скок, М.Ф. Шуба. - К.: Вища шк., 1986. - 224 с.

40 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення впливу аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу шляхом створення тіамін-дефіцитного стану, який **відрізняється** тим, що складають гістограми розподілу амплітуд викликаних електричною стимуляцією нерва потенціалів кінцевої пластинки, проводять їх порівняння і за відхиленнями від норми визначають вплив аліментарного дефіциту вітаміну В₁ на функціонування нервово-м'язового синапсу.

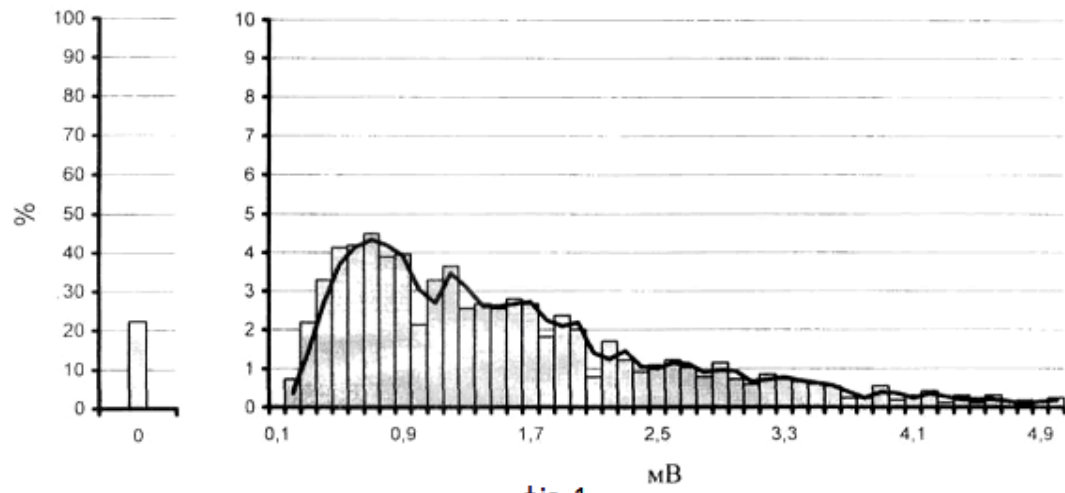
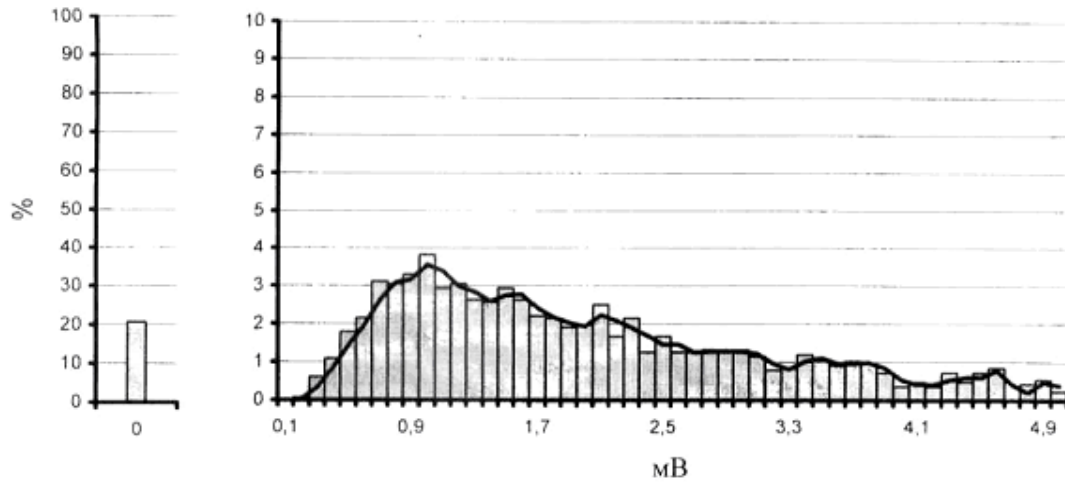
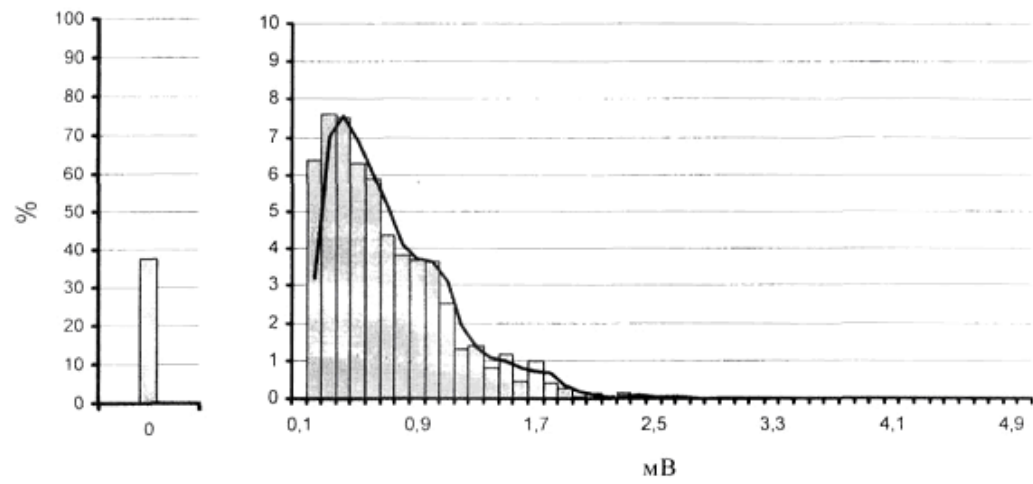
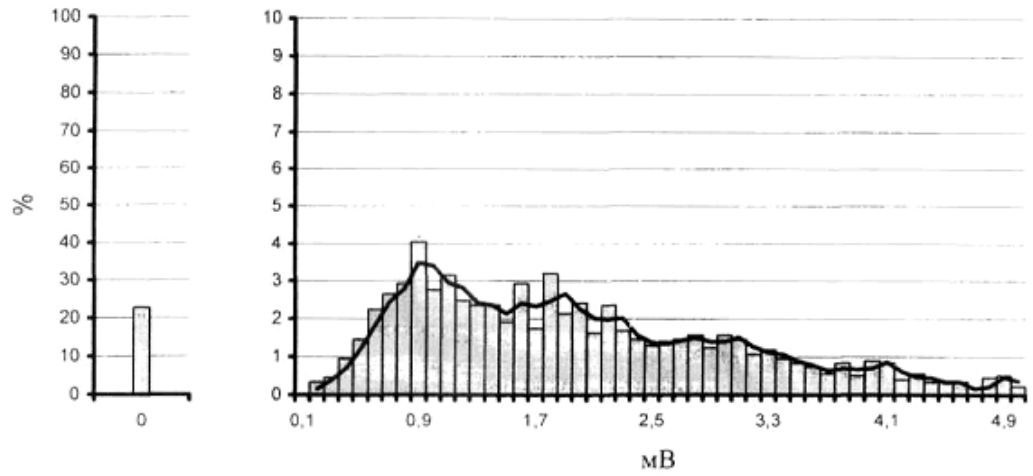
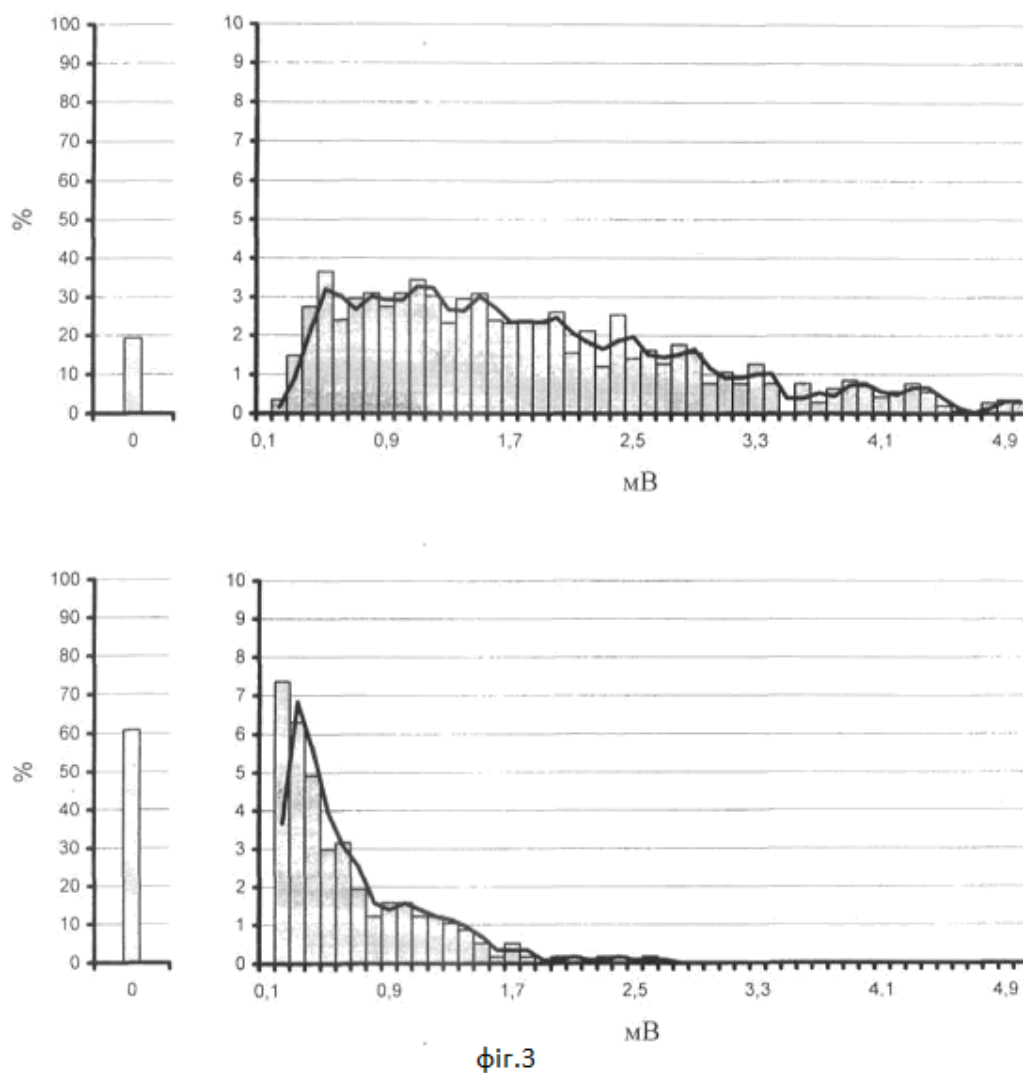


fig..1



фиг.2



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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