



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **97019**

(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: <b>u 2014 10485</b>	(72) Винахідник(и): <b>Романенко Олександр Вікторович (UA), Шепелев Сергей Євгенович (UA), Шепелев Євген Сергійович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>25.09.2014</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.02.2015</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.02.2015, Бюл.№ 4</b>	

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ ВІТАМІНУ В<sub>1</sub> НА ФУНКЦІОНАЛЬНОМУ НЕРВОВО-М'ЯЗОВОМУ СИНАПСУ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення впливу аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу шляхом створення тіамін-дефіцитного стану. Складають гістограми розподілу амплітуд мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки, проводять їх порівняння і за відхиленнями від норми визначають вплив аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу.

UA 97019 U



Корисна модель 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 В<sub>1</sub> (тіаміну) в організмі.

Вітамін В<sub>1</sub> (тіамін) бере участь у забезпеченні функціональної активності нервової, опорно-рухової, серцево-судинної систем, підтриманні моторики шлунково-кишкового тракту. Причинами гострого авітамінозу В<sub>1</sub> з летальними наслідками можуть бути зловживання алкоголем, невгамовна блювота вагітних, деякі операції на шлунково-кишковому тракті, гемодіаліз, парентеральне харчування. Надзвичайно розповсюдженими, навіть серед населення економічно розвинених країн, є субклінічні форми дефіциту тіаміну. Тому актуальність досліджень, спрямованих на встановлення механізмів нейротропної дії вітаміну В<sub>1</sub> в організмі, не викликає сумнівів.

Дефіцит вітаміну В<sub>1</sub> в організмі супроводжується розвитком м'язової слабкості, а в ряді випадків - частковою або повною втратою моторної функції кінцівок. Електрофізіологічними методами у хворих при цьому виявляється зменшення складних потенціалів дії скелетних м'язів [1]. Зареєстровані випадки паралічу дихальної мускулатури під впливом тіамінази, ферменту, що руйнує тіамін, при отруєнні токсинами ціанобактерій [2]. Висловлюється припущення про зв'язок між випадками раптової смерті немовлят і порушенням метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> в діафрагмальному нерві [3]. На здатність вітаміну В<sub>1</sub> впливати на міжклітинну комунікацію вказують дані про послаблення синтезу ацетилхоліну при дефіциті вітаміну В<sub>1</sub> [4] та можливість коригувати розлади, що виникають в цьому випадку, введенням піддослідним тваринам фізостигміну [5, 6]. Ці дані вказують на зв'язок між порушенням метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> та станом синаптичної передачі у холінергічних, і, зокрема, у нервово-м'язових синапсах.

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб визначення впливу аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу [7], який полягає в утримуванні піддослідних тварин на штучному раціоні, позбавленому тіаміну, з подальшою реєстрацією показників спонтанної та викликаного подразненням нерва секреції медіатора з нервових закінчень ізольованої діафрагми. Однак, даний спосіб має недоліки, оскільки передбачає отримання усереднених показників, які не дають інформації про характер розподілу амплітуд мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки в нормі та під впливом аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub>.

Задача, яка вирішується способом, що заявляється - дослідження характеру розподілу амплітуд мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки у синапсах діафрагмального м'яза піддослідних тварин (мишей) за умов аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub>.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який передбачає створення тіамін-дефіцитного стану та обчислення середніх значень амплітуд мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки, згідно з корисною моделлю, складають гістограми розподілу амплітуд мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки, проводять їх порівняння і за відхиленнями від норми визначають вплив аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу.

Спосіб здійснюють 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  $23 \pm 1$  °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 олії рафінована - 8,00 %, сольова суміш - 4 %, вітамінна суміш - 0,5 %. Сольова суміш містить NaCl - 13,9325 %; KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> - 38,8967 %; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O - 5,7302 %; CaCO<sub>3</sub> - 38,1442 %; FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O - 2,6960 %; KI - 0,0790 %; MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O - 0,4453 %; ZnCl<sub>2</sub> - 0,0259 %; CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O - 0,0475 %; CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O - 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 В<sub>12</sub> - 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 В<sub>1</sub> 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 % O<sub>2</sub> та 5 % CO<sub>2</sub>) розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl - 137,0; KCl - 5,0; NaHCO<sub>3</sub> - 11,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,0; глюкоза - 11,0. Досліди проводять при кімнатній температурі (20-21 °C). М'язові скорочення блокують шляхом використання низького вмісту Ca<sup>2+</sup> та високого вмісту Mg<sup>2+</sup> в згаданому розчині Кребса. Для стандартизації досліджень співвідношення Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> повинно бути постійним у всіх дослідах, його підбирають таким чином, щоб отримати максимальну амплітуду потенціалів кінцевої пластинки (ПКП) при гарантованому блокуванні скорочень в препаратах, отриманих від тварин тіамін-контрольної групи. Діафрагмальний нерв стимулюють надпороговими прямокутними 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 мПКП, зареєстрованих в усіх досліджених синапсах кожної експериментальної групи, складають варіаційні ряди [8] з інтервалами, рівними 0,1 мВ [9], в діапазоні 0-3 мВ. Для коректного співставлення варіаційних рядів частоти варіант виражають у відсотках [8]. На підставі отриманих варіаційних рядів будують гістограми розподілу амплітуд мПКП, 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 мПКП в препаратах, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи на 10-й день споживання дієти, демонструє зміщення моди вліво, що свідчить про збільшення частки низькоамплітудних мПКП у порівнянні з контролем (фіг. 1).

Гістограма розподілу амплітуд мПКП в синапсах нервово-м'язових препаратів, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи на 15-й день експерименту, характеризуються появою значної асиметрії. Мода різко зміщена вліво за рахунок елімінації високоамплітудних сигналів та превалювання низькоамплітудних мПКП (фіг. 2).

Гістограма розподілу амплітуд мПКП в синапсах препаратів, отриманих від тварин тіамін-дефіцитної групи на 20-й день споживання ними штучної дієти, в цілому характеризується тими ж ознаками, що і на 15-й день.

Значення модального класу залишається незмінним. Збільшення частки низькоамплітудних мПКП спостерігаються і в контролі (фіг. 3).

При цьому середні значення амплітуди мПКП в синапсах френіко-гемідіафрагмальних препаратів, отриманих від тварин контрольної групи з аліментарним обмеженням та тіамін-дефіцитної групи, становили відповідно 1,02±0,05 мВ та 0,73±0,07 мВ на 10-й день, 1,10±0,07 мВ та 0,43±0,06 мВ на 15-й день, 0,88±0,07 мВ та 0,41±0,04 мВ - на 20-й день споживання відповідних раціонів.

Таким чином, запропонований спосіб дає можливість досліджувати в умовах експерименту стан синаптичної передачі в скелетних м'язах при аліментарному дефіциті вітаміну В<sub>1</sub>, 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 В<sub>1</sub> в організмі.

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, N 3. - P. 357-362.

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, N 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, N 3. - P. 189-196.

7. Патент 38339 UA, МПК G 01 N 1/28, G 01 N 33/48. Спосіб визначення впливу порушення метаболізму вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу / Романенко О.В., Шепелев С.С.; заявник та патентотримувач 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.

20

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

25

Спосіб визначення впливу аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу шляхом створення тіамін-дефіцитного стану, який **відрізняється** тим, що складають гістограми розподілу амплітуд мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки, проводять їх порівняння і за відхиленнями від норми визначають вплив аліментарного дефіциту вітаміну В<sub>1</sub> на функціонування нервово-м'язового синапсу.

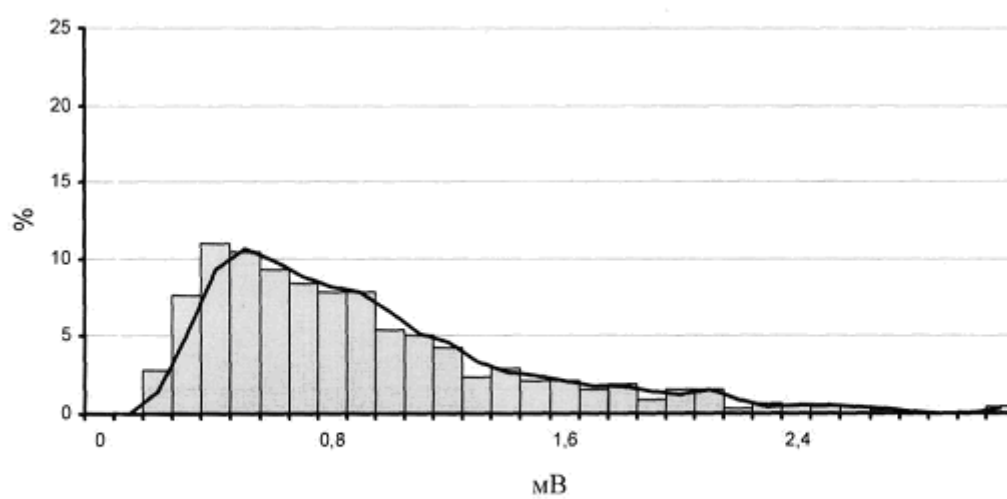
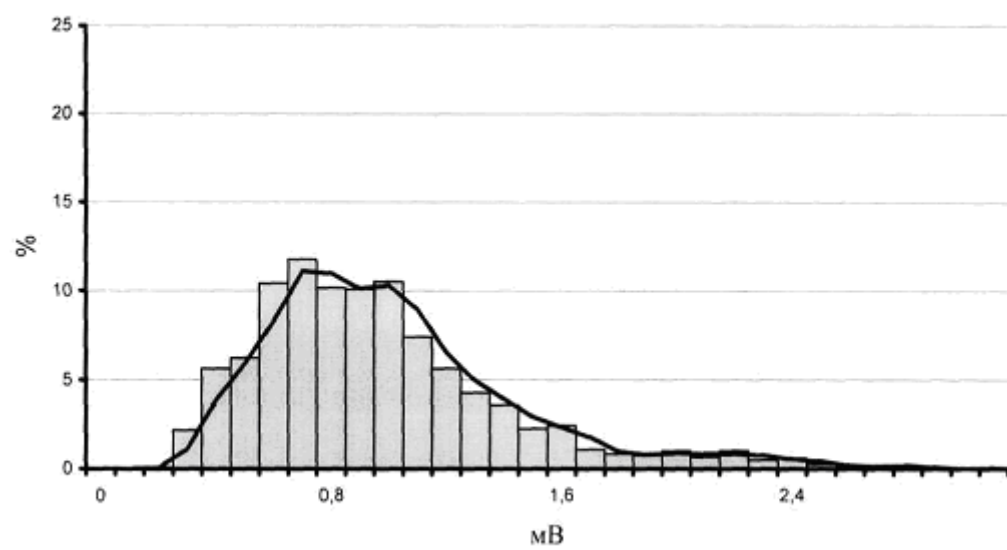
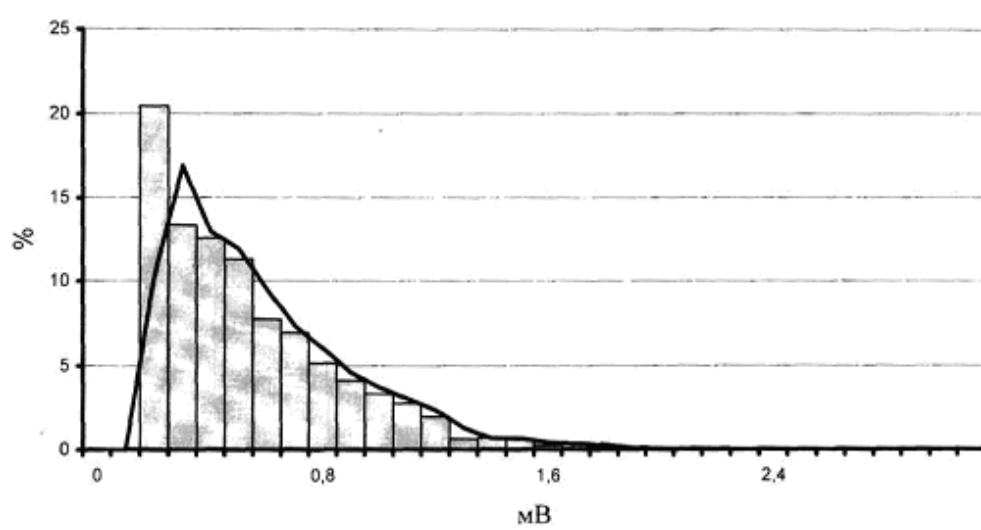
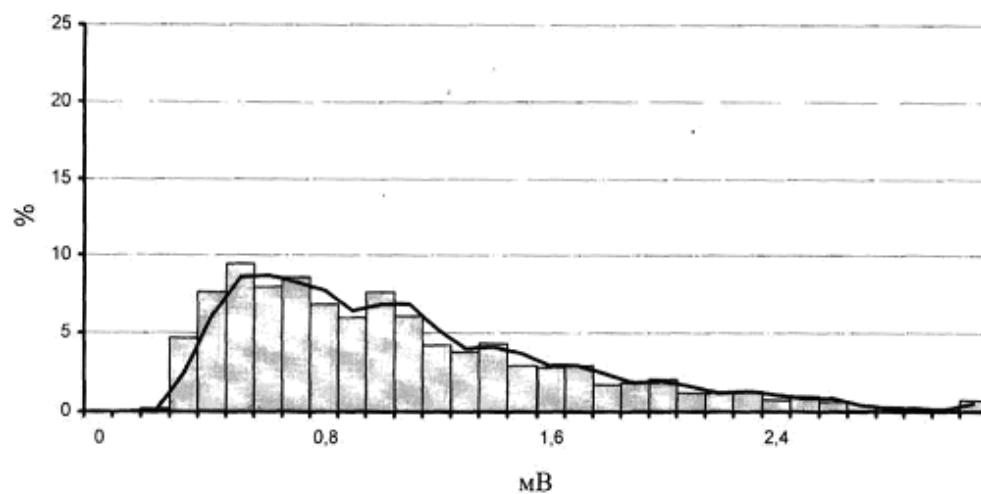
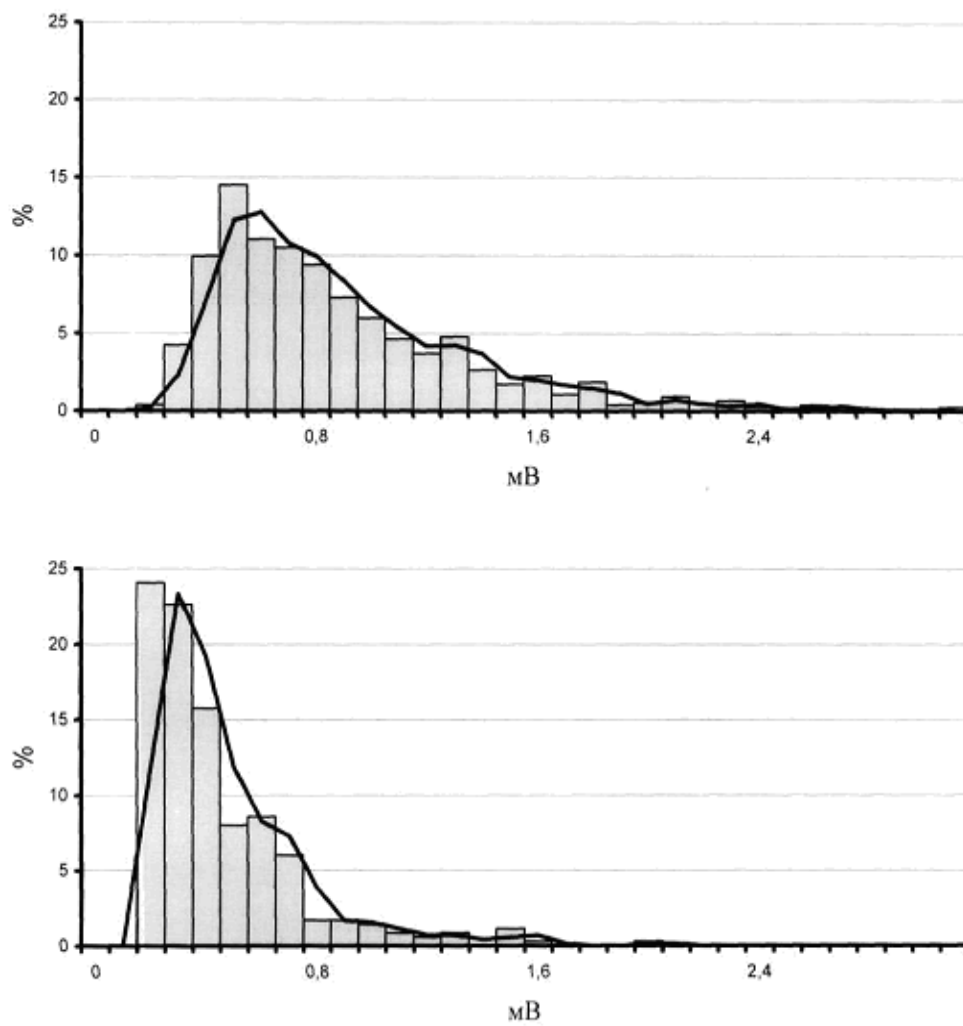


fig.1



φir.2



фiг.3

---

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