



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 83611

(13) U

(51) МПК

G01N 1/28 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 00042**

(22) Дата подання заявки: **02.01.2013**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.09.2013**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.09.2013, Бюл.№ 18**

(72) Винахідник(и):

**Твердохліб Ігор Володимирович (UA),  
Петрук Ніна Сергіївна (UA),  
Іванченко Марина Вікторівна (UA),  
Сілкіна Юлія Валеріївна (UA),  
Хріпков Ігор Сергійович (UA),  
Перцева Наталія Олегівна (UA),  
Шевченко Катерина Іванівна (UA),  
Гудлетт Тетяна Олександрівна (UA),  
Малков Ігор Ігоревич (UA),  
Береговенко Ігор Миколайович (UA),  
Зіненко Дмитро Юрійович (UA),  
Галайда Наталія Олександрівна (UA),  
Варін Владислав Валерійович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД  
"ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА  
АКАДЕМІЯ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ  
ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ",  
вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ,  
49044 (UA)**

## (54) СПОСІБ УСТАНОВЛЕННЯ КООРДИНАТ УЛЬТРАСТРУКТУР ПРИ ТРАНСМІСІЙНІЙ ЕЛЕКТРОННІЙ МІКРОСКОПІЇ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

(57) Реферат:

Спосіб установлення координат ультраструктур при трансмісійній електронній мікроскопії біологічних об'єктів включає підготовку електронно-мікроскопічних сіток. Потім здійснюють перегляд зразка на люмінесцентному екрані електронного мікроскопа, з використанням координатного пристрою, що є частиною його програмного забезпечення. На обідок опорної сітки попередньо наноситься крапковий орієнтир, що забезпечує її просторово-фіксоване розміщення у тримачі об'єкта під час кожного застосування.

UA 83611 U



Корисна модель належить до медицини та біології, зокрема гістології, цитології, анатомії, патологічної анатомії, вірусології для удосконалення процесу дослідження біологічних тканин за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії при проведенні експериментальних та клінічних досліджень.

Найближчим аналогом на сьогодні є стандартизований метод дослідження ультратонких зрізів, який передбачає ультрамікротомію епоксидних блоків з величиною кроку 60-90 нм з отриманням сріблястих зрізів та подальшим їх розміщенням на опорних сітках (Mesh Regular Grid), подвійне контрастування за стандартною методикою (методом Рейнольдса), перегляд на люмінесцентному екрані електронного мікроскопа та фотореєстрація вибраних зон досліджуваного об'єкта [1].

Однак недоліки найближчого аналога виявляються при рутинному вивченні кожної комірки сітки на великих збільшеннях ( $\times 1000-100000$ ), що потребує систематичного її перегляду від одного боку до іншого в певній послідовності, з подальшою фотозйомкою структур, обраних дослідником. На сучасних електронних мікроскопах для реєстрації об'єкта використовується фотоплівка, максимальне число знімків обмежене кількістю заряджених касет у фотокамері та при експонуванні всіх плівок перезарядка фотокамери потребує часу, що уповільнює процес дослідження. Важливим є вивчення взаємовідношень різних компонентів тканини під час безпосереднього перегляду зразка, що значно обмежується під час аналізу отриманого зображення тільки з фотографії. Саме перегляд зрізів безпосередньо на екрані мікроскопа дає можливість скласти повноцінне уявлення про ультраструктуру досліджуваного об'єкта та провести його порівняльний (морфологічний) аналіз у різних зонах. Але при цьому дослідник витрачає багато часу на пошук необхідного об'єкта та такого, що вже був переглянутий, особливо якщо перед тим зупинив перегляд чи вийняв сітку [2].

На сучасному ринку видаткових матеріалів для трансмісійної електронної мікроскопії існують так звані "індексні" сітки (Index Mesh, Finder Grids), що характеризуються наявністю алфавітно-цифрової ідентифікації комірок та дозволяють досліднику мінімізувати вищезазначені недоліки. Проте вартість таких сіток у декілька разів вища за загальноновживані [3].

В основу корисної моделі поставлена задача розробити такий спосіб дослідження ультратонких зрізів, який міг би суттєво раціоналізувати витрачання часу впродовж сеансу електронної мікроскопії, значно полегшити роботу дослідника, знизити навантаження на його зоровий аналізатор, а також скоротити витрати видаткових матеріалів за рахунок доцільного використання ресурсів програмного забезпечення мікроскопа.

Поставлена задача вирішується тим що перед укладкою ультратонких зрізів на мідному ободку опорної сітки за допомогою біокулярного мікроскопа (МБС-10) та препарувальної голки проколюється отвір, який в подальшому слугує орієнтиром для установки сітки у тримач об'єкта мікроскопа (фіг. 1). Завдяки координатному пристрою, що є частиною програмного забезпечення електронного мікроскопа, та описаному способу маркування сітки можливо "запам'ятовувати" координати (x, y) вибраної ділянки, що в подальшому забезпечує швидкий пошук раніше переглянутої ділянки об'єкта у випадках, якщо сеанс був припинений, сітка була вийнята з тримача об'єкта та коли дослідження зрізу продовжується іншим користувачем електронного мікроскопа.

Із найближчим аналогом заявлена корисна модель збігається тим, що до отримання кінцевого результату (фотографії об'єкта) зразок проходить ті ж самі підготовчі етапи на стандартизованому обладнанні з використанням загальнодоступних матеріалів. відрізняється від найближчого аналога тим, що на обідок опорної сітки наноситься крапковий орієнтир, що забезпечує її просторово-фіксоване розміщення у тримачі об'єкта під час кожного застосування.

Корисна модель реалізується таким чином:

1. Електронно-мікроскопічну сітку розміщують на фільтрувальному папері матовою стороною догори під об'єктивом біокулярного мікроскопа МБС-10, де за допомогою препарувальної голки на її обідку роблять прокол, тобто наносять крапковий орієнтир (фіг. 1).

2 Отримані на ультрамікротомі зрізи укладають на матову поверхню промаркерованої сітки.

3. Опорну сітку із попередньо відконтрастованими зрізами розміщують у тримачі об'єкта так, щоб її крапковий орієнтир співпадав з міткою на тримачі, що відповідає 3 годинам умовного годинникового циферблату (фіг. 2).

4. До введення електронно-мікроскопічної сітки до камери об'єкта в інтерфейсі програмного забезпечення електронного мікроскопа викликають вікно Stage Coordinates та приводами стола об'єкта встановлюють поточні координати на (0;0) (фіг. 3).

5. Вводять об'єкт до колони мікроскопа та на малому збільшенні ( $\times 100$ ; Low Magnification) перевіряють коректність постановки сітки у тримачі об'єкта. Так центр опорної сітки має співпадати з початком координат (0;0).

6. Приступають до перегляду зразка та, вибравши необхідне поле зору, записують координати ділянки натисканням кнопки Мемо, додаючи при цьому відповідні пояснення та величину електронно-оптичного збільшення (Comment) (фіг. 4).

7. При виникненні необхідності в процесі дослідження повернутися до занотованої ділянки зразка, приводами стола об'єкта встановлюють її координати у верхній рядок вікна Stage Coordinates.

Таким чином, після проведення експериментального випробування запропонованого способу дослідження ультратонких зрізів за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії заявником встановлено, що заявлений спосіб суттєво підвищує ефективність та скорочує час роботи при перегляді об'єкта завдяки цілеспрямованому дослідженню вибраних раніше ділянок сітки та дозволяє продовжити вивчення зразка на перерваному етапі дослідження, у випадку, коли його рутинне дослідження було перервано. Заявлений метод дозволяє більш ретельно підготуватися до фотозйомки об'єкта за рахунок планування цього процесу та зарядження необхідної кількості касет у фотокамеру, а також знизити витрати фотоплівки завдяки зменшенню числа пробних фотознімків. Також вивчення попередньо вибраних ділянок зрізу може бути виконано іншим дослідником. Разом з цим, описаний метод вивчення ультратонких зрізів дозволяє подовжити ресурс катода (Filament Life) за рахунок скорочення загального часу його роботи (Service Life), а також завдяки заявленому способу маркування опорної сітки, є гідною альтернативою використанню високовартісних "індексних" сіток. Це дозволяє суттєво скоротити матеріальні витрати у розрахунку на одне дослідження.

Перелік фігур креслення

Фіг. 1. Нанесення крапкового орієнтиру на обідку опорної сітки за допомогою голки під об'єктивом бінокулярного мікроскопа МБС-10.

Фіг. 2. Орієнтація промаркованої опірної сітки відповідно мітки на тримачі об'єкта.

Фіг. 3. Виклик вікна Stage Coordinates та встановлення поточних координат на (0;0) перед введенням опорної сітки до камери об'єкта.

Фіг. 4. Запис (Мемо) вибраної ділянки зрізу із додавання коментарів (Comment) у вікні програмного модуля Stage Coordinates.

Джерела інформації:

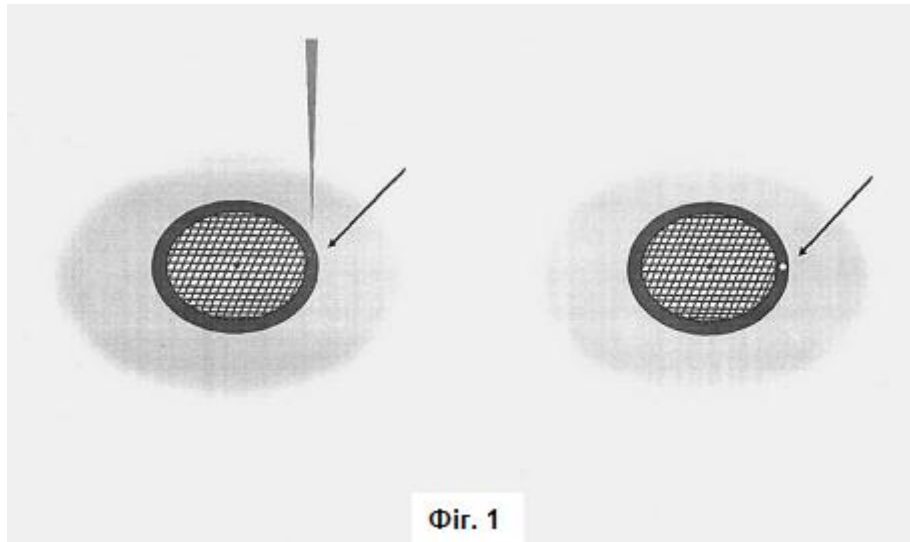
1. Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols / John Kuo. - Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2007.-608 p.

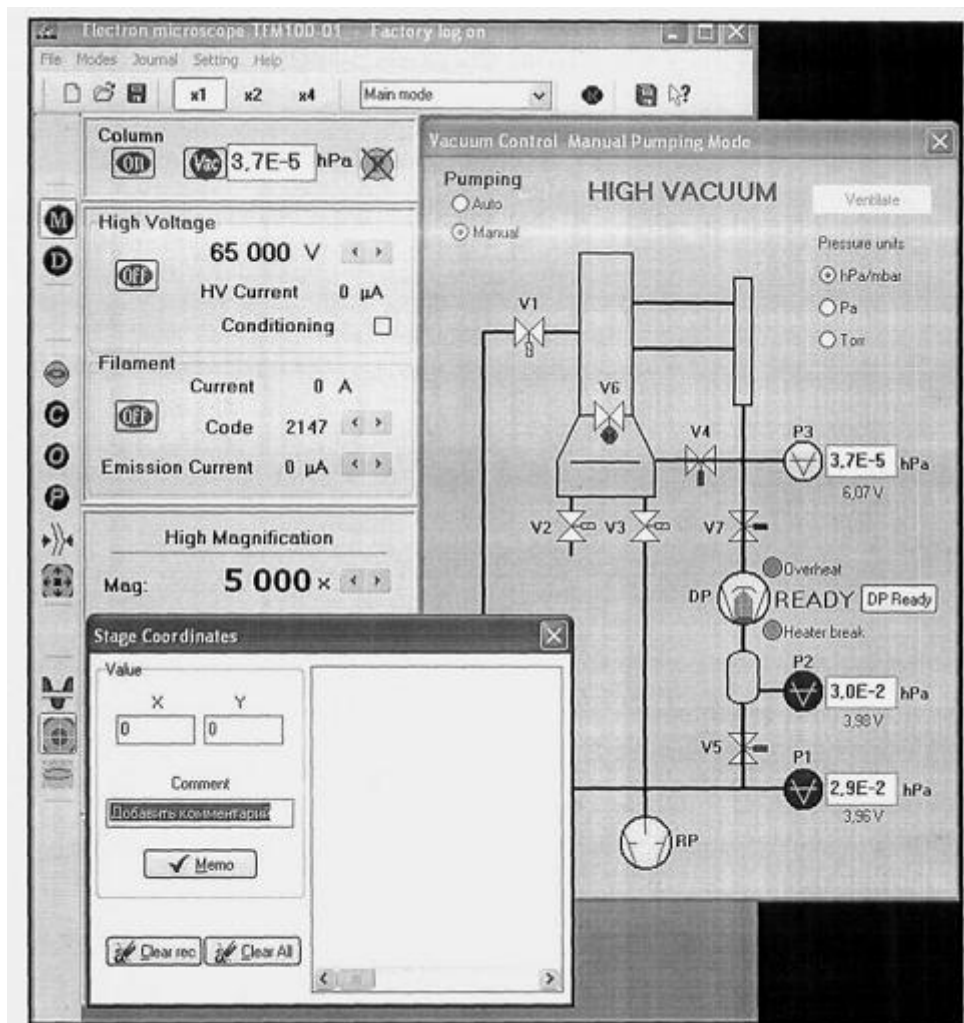
2. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих: [пер. с англ.] / Б. Уикли. - М.: Мир, 1975.-178 с.

3. SPI Index Grids [Електронний ресурс] <http://www.2spi.com/catalog/grids/index-gr.php>

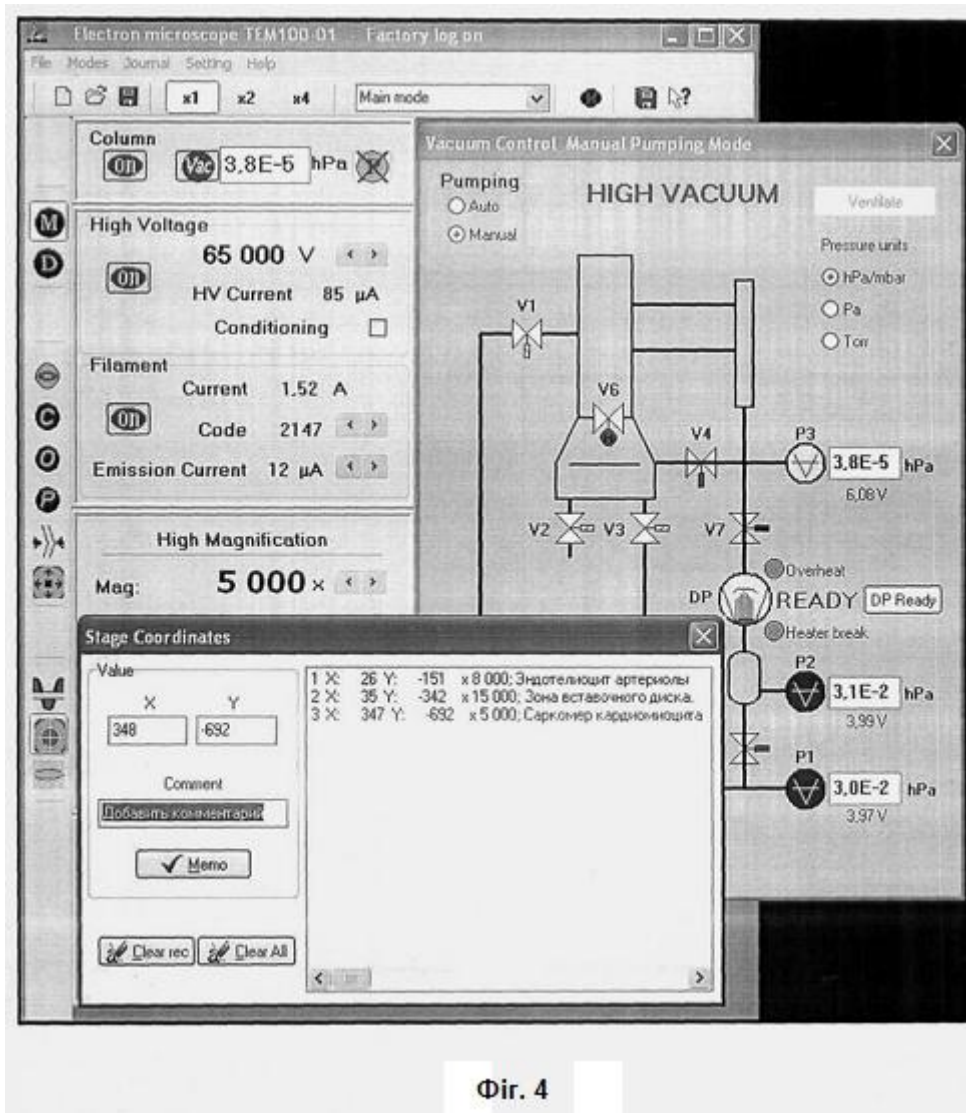
#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб установлення координат ультраструктур при трансмісійній електронній мікроскопії біологічних об'єктів, що включає підготовку електронно-мікроскопічних сіток та наступний перегляд зразка на люмінесцентному екрані електронного мікроскопа, з використанням координатного пристрою, що є частиною його програмного забезпечення, який **відрізняється** тим, що на обідку опорної сітки попередньо наноситься крапковий орієнтир, що забезпечує її просторово-фіксоване розміщення у тримачі об'єкта під час кожного застосування.





Фиг. 3



Комп'ютерна верстка М. Мацело

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