



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 59109

(13) A

(51) 7 A61B5/02

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

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТЕРЕОМЕТРИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК УЛЬТРАСТРУКТУР КЛІТИН

1

2

(21) 2003010606

(22) 23 01 2003

(24) 15 08 2003

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р.

(72) Машталір Марина Анатоліївна, Твердохліб Ігор Володимирович, Сілкина Юлія Валеріївна, Хрипков Ігор Сергійович, Терещенко Наталія Миколаївна, Горелова Наталія Іванівна, Наumenko Леонід Юрійович, Макарчук Олександр Іванович, Горелов Олександр Михайлович, Малков Ігор Ігоревич, Новіков Сергій Павлович

(73) Машталір Марина Анатоліївна, Твердохліб Ігор Володимирович, Сілкина Юлія Валеріївна, Хрипков Ігор Сергійович, Терещенко Наталія Миколаївна, Горелова Наталія Іванівна, Наumenko Леонід Юрійович, Макарчук Олександр Іванович, Горелов Олександр Михайлович, Малков Ігор Ігоревич, Новіков Сергій Павлович

(57) Спосіб визначення стереометричних характеристик ультраструктур клітин, що включає стереометричну оцінку мікрофотографії з використанням стандартних окулярних вставок світлооптичного мікроскопа, який відрізняється тим, що додатково визначають довжину контактуючої поверхні кожного компартменту, відстань між контактуючими поверхнями компартментів, а надалі обчислюють

ступінь просторового сполучання структурно-функціональних компартментів і визначають стереометричні характеристики ультраструктур клітин, причому, якщо $S < 1$ - визначають ступінь просторового сполучання компартментів як низький, якщо S знаходиться у межах від 1 до 5 - встановлюють середній ступінь просторового сполучання компартментів, а якщо $S > 5$ - визначають високий ступінь просторового сполучання компартментів, за умов, що

$$S = \frac{L_1 + L_2 + L_n}{l_{cp}},$$

де S - критерій ступеня просторового сполучання компартментів,

L_1, L_2, L_n - довжина контактуючої поверхні компартменту, мкм,

l_{cp} - середня відстань між контактуючими поверхнями компартментів, а

$$l_{cp} = \frac{l_1 + l_n}{n},$$

де l_1, l_n - відстань між контактуючими поверхнями компартментів на одній вимірюваній ділянці, мкм, n - кількість вимірюваних ділянок

Винахід відноситься до медицини, зокрема до визначення, вимірювання, або реєстрації з діагностичною ціллю та може бути використаним в патологічній анатомії та патофізіології, переважно для визначення функціонального стану серцево-судинної системи

Кількісна оцінка різних параметрів морфологічних об'єктів потребує таких вимог, як надійність, точність, простота та достовірність висновків будь якого морфологічного дослідження. У зв'язку з цим розроблені та продовжують активно розроблятися багаточисленні методи кількісного стереометричного аналізу тканин та органів. При цьому використовуються різні стереометричні тест-системи, вибір яких визначається конкретними морфологічними задачами дослідника. Найбільш розповсюджені в цій області методи стереометрії на орган-

ному та тканинному рівнях, які ґрунтуються на використанні стандартних окулярних вставок світлового мікроскопа. Менш розробленими залишаються методи, направлені на стереометричну оцінку ультраструктур на клітинному рівні, що пов'язано з використанням електронної мікроскопії та необхідністю проведення багато численних проміжних етапів кількісного ультрамікроскопічного дослідження. В свою чергу, це робить дослідження дорогим та накладає суттєві обмеження на якість рішення конкретних наукових задач. До сих пір створення ефективних методів кількісної оцінки ультраструктур біологічних об'єктів залишається актуальною проблемою в морфології та є стимулом для подальшого покращення методичних способів, адекватних задачам морфологічного експерименту

(13) A

(11) 59109

(19) UA

В морфологічних дослідженнях відомий спосіб вимірювання основних стереометричних параметрів, оснований на використанні стандартних окулярних вставок світлооптичного мікроскопу, які являють собою тест-системи різних типів. К недолікам цього методу слід віднести його обмежену точність та чутливість, оскільки максимальне збільшення при світловій мікроскопії менше порога, необхідного для повноцінного стереометричного аналізу багатьох ультра- та мікроструктур [1].

Відомий спосіб ультраструктурометрії біологічних об'єктів, що включає стереометричну оцінку мікрофотографії з використанням стандартних окулярних вставок світлооптичного мікроскопа, у відповідності з яким, виготовляють позитивну мікрофотографію, накладають на останню нанесену на прозору стандартну окулярну вставку, розраховують кінцеве збільшення мікрофотографії та проводять стереометричну оцінку ультраструктур, за умови, що

$A=BC$,

де A - кінцеве збільшення мікрофотографії,

B - збільшення електронного мікроскопа,

C - проміжне збільшення мікрофотографії при проекції на фотобумагу [2].

Причиною, що стримує досягнення очікуваного технічного результату, є обмежена інформативність дослідження, обумовлена неможливістю кількісної оцінки різнорідних ультраструктур, розміри яких на виготовленій мікрофотографії надвеликі чи надмалі, що не співпадає з масштабами тест-системи. Обмежена точність дослідження, яка пов'язана з неточністю визначення проміжних збільшень мікрофотографії, зниженням якості зображення в процесі виготовлення фотографії, а також з виникненням систематичної помилки внаслідок проведення стереометрії ультраструктур, які мають таку ж товщину, як і тестова лінія, чи співпадають з точкою перетину тест-системи. Висока матеріалоемність та тривалість дослідження пов'язані з необхідністю виготовлення мікрофотографій, визначенням проміжних збільшень мікрофотографій, отриманням електронogram на великих збільшеннях для оцінки ультраструктур малих розмірів.

В основу винаходу поставлено задачу розробити такий спосіб визначення стереометричних характеристик ультраструктур клітин, який дозволяє одночасно оцінити структури з різними розмірами на всій поверхні досліджуваного об'єкту, підрахувати загальну кількість тих чи інших структур, оцінити ступінь просторового сполучання між структурно-функціональними компартментами клітин та тканин, що підвищує інформативність та точність дослідження, знижує його тривалість та матеріалоемність.

Означений вище технічний результат досягається тим, що у відомому способі визначення стереометричних характеристик ультраструктур клітин, що включає стереометричну оцінку мікрофотографії з використанням стандартних окулярних вставок світлооптичного мікроскопа, який відрізняється тим, що, додатково визначають довжину контактуючої поверхні кожного компартменту, відстань між контактуючими поверхнями компартментів, а надалі обчислюють ступінь просторового

сполучання структурно-функціональних компартментів і визначають стереометричні характеристики ультраструктур клітин, причому, якщо $S < 1$ - визначають ступінь просторового сполучання компартментів як низьку, якщо S знаходиться у межах від 1 до 5 - встановлюють середню ступінь просторового сполучання компартментів, а якщо $S > 5$ - визначають високу ступінь просторового сполучання компартментів, за умов, що

$$S = \frac{L_1 + L_2 + L_n}{l_{cp}},$$

де S - критерій ступеню просторового сполучання компартментів,

L_1, L_2, L_n - довжина контактуючої поверхні компартменту, мкм,

l_{cp} - середня відстань між контактуючими поверхнями компартментів, а

$$l_{cp} = \frac{l_1 + l_n}{n},$$

де l_1, l_n - відстань між контактуючими поверхнями компартментів на одній вимірюємій ділянці, мкм,

n - кількість вимірюємих ділянок.

Причинно-наслідковий зв'язок сукупності істотних ознак з означеним вище технічним результатом полягає в тому, що для визначення стереометричних характеристик ультраструктур клітин та біологічних тканин з'являється можливість проводити дослідження різнорідних ультраструктур, які мають різні розміри, підраховувати кількість структур, оцінювати ступінь просторового сполучання структурно-функціональних компартментів в біологічному об'єкті, а також досліджувати фотопластину при великих збільшеннях по всій її площині шляхом вільного пересування по предметному столику мікроскопа. Все це підвищує інформативність способу визначення стереометричних характеристик у порівнянні з прототипом. За рахунок відсутності проміжних етапів (виготовлення мікрофотографій, підбір та розрахунок проміжних збільшень) суттєво підвищується точність дослідження, знижується його тривалість та матеріалоемність.

Для доведення можливості відтворення способу з отриманням вищезазначеного технічного результату, проведено дослідження на серці щура.

Результати проведених досліджень на експериментальних тваринах дозволили встановити, що стереометрична оцінка електронogram, яку проводять безпосередньо на фотопластинці при різних збільшеннях стереоскопічного мікроскопу дає можливість проводити стереометрію різнорідних ультраструктур, що мають різні розміри, підраховувати кількість структур, оцінювати ступінь просторового сполучання структурно-функціональних компартментів в біологічному об'єкті.

Отже, сукупність відокремлюючих ознак винаходу, що заявляється, є істотною, бо має причинно-наслідковий зв'язок з підвищенням інформативності та точності дослідження, зменшенням матеріалоемності та тривалості обробки біологічного матеріалу.

Відомості, що підтверджують можливість здійснення способу визначення стереометричних характеристик ультраструктур клітин, що заявляється

ся, полягають в наступному

Для здійснення способу визначення стереометричних характеристик ультраструктур клітин необхідне таке обладнання і матеріали як набір реактивів, ультрамікроскоп, електронний мікроскоп, окулярні вставки у вигляді лінійки

Фіксування та заливку матеріалу виконують за традиційною схемою [3]

Спосіб визначення стереометричних характеристик ультраструктур клітин виконують наступним чином

Приклад 1

Ультратонкий зріз 0,08мкм завтовшки, виготовлений з тканини міокарда білого безпорядного щура-самця (вагою 180г) по стандартній методиці [3], досліджували в електронному мікроскопі. Фотопластинку з поля зору мікроскопа виготовили при збільшенні 3000. Оброблену та висушену фотопластинку розмістили на предметному столику стереоскопічного мікроскопа. Визначили, що кількість мітохондрій в 100мкм² кардіоміоцита дорівнює 51 одиниці. Підраховували довжину поверхні мітохондрій, контактуючої з кардіоміоцитом (L₁) - 12,3мкм, підраховували довжину контактуючої з мітохондрією поверхні кардіоміоцита (L₂), яка дорівнює 10,2мкм. Зробили виміри відстані між кардіоміоцитом та мітохондрією на трьох ділянках (l₁, l₂, l₃) та обчислили l_{cp}=2. Потім за допомогою формули

$$S = \frac{L_1 + L_2 + L_n}{l_{cp}},$$

визначили, що критерій S становить 11,25

одиниць, що говорить про високий ступінь просторового сполучання двох компартментів (мітохондрію та кардіоміоцитом)

Таким чином спосіб визначення стереометричних характеристик ультраструктур клітин дозволяє при використанні однієї фотопластини визначити параметри гетерогенних ультраструктур, розміри яких відрізняються більш ніж на 2 порядки (міофібрили, включення ліпідів та глікогену, мітохондрії, кристи мітохондрій), та потребують використання різних збільшень та різних тестових систем. Крім того, вільно переміщуючи фотопластину, вказані параметри можливо визначити по всій площині електроннограми та значно збільшити ефективність її використання. Також з'являється можливість оцінити ступінь просторового сполучання структурно-функціональних компартментів в клітині та біологічній тканині.

Отже, розроблений об'єкт відповідає умовам «промислової придатності», «новизна», «винахідницький рівень» і може бути кваліфікований винаходом України.

Джерела інформації

- 1 Непомнящих Л.М. Патологическая анатомия и ультраструктура сердца (Комплексное морфологическое исследование общепатологического процесса в миокарде) - Новосибирск: Наука, 1981 - 324с.
- 2 Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство - М.: Медицина, 1990 - 384с.
- 3 Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. Пер. с англ. - М.: Мир, 1975 - з 178с.