



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60078 (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 ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ МІОКАРДА

1

2

(21) 2003010603

(22) 23 01 2003

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.

(72) Твердохліб Ігор Володимирович, Машталір Марина Анатоліївна, Сіпкіна Юлія Валеріївна, Хрипков Ігор Сергійович, Романенко Людмила Арнольдівна, Терещенко Наталія Миколаївна, Горелова Наталія Іванівна, Морозова Світлана Борисівна, Маєр Ганна Олександрівна, Крамар Світлана Борисівна, Шаторна Віра Федорівна

(73) Твердохліб Ігор Володимирович, Машталір Марина Анатоліївна, Сіпкіна Юлія Валеріївна, Хрипков Ігор Сергійович, Романенко Людмила Арнольдівна, Терещенко Наталія Миколаївна, Горелова Наталія Іванівна, Морозова Світлана Борисівна, Маєр Ганна Олександрівна, Крамар Світлана Борисівна, Шаторна Віра Федорівна

(57) Спосіб визначення енергетичного метаболізму міокарда, що включає аналіз інтенсивності різних метаболічних циклів в одному зразку тканини міокарда шляхом паралельного порівняння активності цитоплазматичної та мітохондріальної фракцій різних ферментів енергетичного метаболізму після проведення пістохімічної реакції з виконанням зрізів досліджуваної тканини, який відрізняється тим, що додатково проводять пістохімічну реакцію на сукцинатдегідрогеназу, отримують гранули солі тетразолію, а надалі заливають зріз у суміш епона з арандїтом, визначають кількість точок перетинів ліній, які припадають на структуру досліджуваної тканини, обчислюють питому та загальний питомий

об'єм високоенергетичних мітохондрій та оцінюють рівень енергетичного метаболізму міокарда, за умови, якщо кількість гранул солі тетразолію становить до 10 одиниць, а загальний питомий об'єм високоенергетичних мітохондрій - менше $0,27 \text{ мкм}^3$, встановлюють низький рівень енергетичного метаболізму, якщо кількість гранул солі тетразолію становить 10-15од, а загальний питомий об'єм високоенергетичних мітохондрій становить $0,28-0,31 \text{ мкм}^3$, - середній рівень, а якщо кількість гранул солі тетразолію сягає більше 15од і загальний питомий об'єм високоенергетичних мітохондрій більше $0,31 \text{ мкм}^3$, - високий рівень енергетичного метаболізму, при цьому питому та загальний об'єми високоенергетичних мітохондрій обчислюють за формулами

$$V_n = P_m / P,$$

де V_n - питомий об'єм високоенергетичної мітохондрії, мкм^3 , P_m - кількість точок перетину ліній стандартної окулярної вставки, які припадають на високоенергетичну мітохондрію, P - загальна кількість точок перетину ліній стандартної окулярної вставки,

$$V = V_{n1} + V_n,$$

де V - загальний об'єм високоенергетичних мітохондрій, мкм^3 , V_{n1} - питомий об'єм однієї високоенергетичної мітохондрії, мкм^3 , i - кількість досліджуваних високоенергетичних мітохондрій

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

Відомий спосіб визначення енергетичного метаболізму міокарда, що включає аналіз інтенсивності різних метаболічних циклів в одному зразку тканини міокарда шляхом паралельного порівняння активності цитоплазматичної та мітохондріаль-

ної фракцій різних ферментів енергетичного метаболізму після проведення пістохімічної реакції з виконанням зрізів досліджуваної тканини, у відповідності з яким, проводять спектрофотометричну реєстрацію утворення відновленої форми нікотинаміддинуклеотида в інкубаційному середовищі [1]

Причиною, що стримує досягнення очікуваного технічного результату, є неможливість паралельно з пістохімічним проводити морфологічний аналіз

(13) A

(11) 60078

(19) UA

біологічного зразка, що знижує інформативність методу

В основу винаходу поставлено задачу розробити такий спосіб визначення енергетичного метаболізму міокарда, який шляхом одночасного гістохімічного та морфологічного аналізу міокарду підвищує інформативність способу при використанні

Означений вище технічний результат досягається тим, що у відомому способі визначення енергетичного метаболізму міокарда, що включає аналіз інтенсивності різних метаболічних циклів в одному зразку тканини міокарда шляхом паралельного порівняння активності цитоплазматичної та мітохондріальної фракцій різних ферментів енергетичного метаболізму після проведення гістохімічної реакції з виконанням зрізів досліджуваної тканини, який відрізняється тим, що, додатково проводять гістохімічну реакцію на сукцинатдегідрогеназу, отримують гранули солі тетразоліа, а надалі заливують зріз у суміш епона з аралдітом, визначають кількість точок перетинів ліній, які припадають на структуру досліджуваної тканини, обчислюють питомі та загальний питомий об'єм високоенергетичних мітохондрій, та оцінюють рівень енергетичного метаболізму міокарда за умови, якщо кількість гранул солі тетразоліа становить до 10 одиниць, а загальний питомий об'єм високоенергетичних мітохондрій менше $0,27 \text{ мкм}^3$ - встановлюють низький рівень енергетичного метаболізму, якщо кількість гранул солі тетразоліа становить 10-15 од., а загальний питомий об'єм високоенергетичних мітохондрій становить $0,28-0,31 \text{ мкм}^3$ - середній рівень, а якщо кількість гранул солі тетразоліа сягає більше 15 од. і загальний питомий об'єм високоенергетичних мітохондрій більше $0,31 \text{ мкм}^3$ - високий рівень енергетичного метаболізму, при цьому питомі та загальні об'єми високоенергетичних мітохондрій обчислюють за формулами

$$V_n = P_m / P,$$

де V_n - питомий об'єм високоенергетичної мітохондрії, мкм^3 ,

P_m - кількість точок перетину ліній стандартної окулярної вставки, які припадають на високоенергетичну мітохондрію,

P - загальна кількість точок перетину ліній стандартної окулярної вставки,

$$V = V_{n1} + V_{n2},$$

де V - загальний об'єм високоенергетичних мітохондрій, мкм^3 ,

V_{n1} - питомий об'єм однієї високоенергетичної мітохондрії, мкм^3 ,

i - кількість досліджуваних високоенергетичних мітохондрій

Приведені показники, за якими оцінюють рівень енергетичного метаболізму міокарда, є оптимальними, що доведено багаточисленими дослідженнями

Причинно-наслідковий зв'язок сукупності істотних ознак з означеним вище технічним результатом полягає в тому, що для визначення енергетичного метаболізму міокарда проводять гістохімічний аналіз зразку, а потім, після додаткової обробки, проводять морфологічний аналіз, визначаючи кількість високоенергетичних мітохондрій, їхній загальний об'єм, за допомогою математичного

аналізу визначають рівень енергетичного метаболізму міокарда, чим підвищують інформативність способу

Гістохімічним критерієм стану енергетичного метаболізму міокарду є кількість гранул солі тетразоліа в цитоплазмі та мітохондріях клітини, яка є показником активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) - ключового ферменту циклу трикарбонових кислот. Морфологічним критерієм рівня енергетичного метаболізму є питомий об'єм високоенергетичних мітохондрій. Визначення енергетичного метаболізму міокарда має особливе значення при ряді захворювань серцево-судинної системи, які потребують діагностичної біопсії міокарда [2, 3]

Для доведення можливості відтворення способу з отриманням вищезазначеного технічного результату, проведено дослідження на 4 серцях щурів

Результати проведених досліджень на експериментальних тваринах дозволили встановити, що рівень енергетичного метаболізму залежить не тільки від активності СДГ, але і від загального питомого об'єму високоенергетичних мітохондрій. Визначення цих показників підвищує інформативність заявляемого способу у порівнянні з прототипом

Отже, сукупність відокремлюючих ознак винаходу, що заявляється, є істотною, бо має причинно-наслідковий зв'язок з підвищенням інформативності

Відомості, що підтверджують можливість здійснення способу визначення енергетичного метаболізму міокарда, що заявляється, полягають в наступному

Для здійснення способу визначення енергетичного метаболізму міокарда необхідне таке обладнання і матеріали як набір реактивів, криостатний мікротом, ультрамікротом, електронний мікроскоп, стандартні окулярні вставки

Фіксування та заливку матеріалу виконують за традиційною схемою [4]

Спосіб визначення енергетичного метаболізму міокарда виконують наступним чином

Відразу після взяття біоптату його охолоджують рідким азотом. Потім на криостатному мікротомі отримують зрізи 20 мкм завтовшки. Зрізи розміщують в інкубаційному середовищі, яке складається з основного розчину (2 мл), 1 М сукцинату ($0,2 \text{ мл}$), $0,5\%$ менадіон ($2-3$ краплі), феназінметасульфат ($0,1 \text{ мг}$), $\text{pH} 7,5$. Інкубацію проводять $5-15$ хвилин при температурі 37°C . Після промивки в фізіологічному розчині (15 хвилин) фіксують в охолодженій суміші, яка містить 2% розчин параформу і $2,5\%$ глютарового альдегіду на $0,1 \text{ М}$ фосфатному буфері ($\text{pH} 7,3$). Матеріал дофіксують у 1% розчині чотирьохоксидного осмію на тому ж буфері, зневоджують в охолоджених розчинах спиртів і ацетонів зростаючої концентрації і заливують в суміш епона з аралдітом. На ультрамікротомі отримують ультратонкі зрізи 1 мкм завтовшки, які контрастують ураніл-ацетатом і цитратом свинцю та оцінюють в електронному мікроскопі

При проведенні візуального обстеження біоптату за допомогою електронного мікроскопа визначають кількість гранул солі тетразоліа, яка випадає в осадок при гістохімічній реакції на СДГ. За

допомогою методу точкового аналізу [5] з використанням стандартних окулярних вставок визначають питомий об'єм високоенергетичної мітохондрії, який розраховують за формулою

$$V_n = P/P,$$

де V_n - питомий об'єм високоенергетичної мітохондрії, мкм^3 ,

P_1 - кількість точок перетину ліній стандартної окулярної вставки, які припадають на структуру,

P - загальна кількість точок перетину ліній стандартної окулярної вставки,

Загальний питомий об'єм (ЗПО) високоенергетичних мітохондрій визначають за формулою

$$V = V_{n1} + V_{n2},$$

де V - загальний об'єм високоенергетичних мітохондрій, мкм^3 ,

V_{n1} - питомий об'єм однієї високоенергетичної мітохондрії, мкм^3 ,

1 - кількість досліджуваних високоенергетичних мітохондрій

Оцінюють рівень енергетичного метаболізму в міокарді за кількістю гранул солі тетразолю та по ЗПО високоенергетичних мітохондрій в зразку. Якщо кількість гранул становить до 10 одиниць, а ЗПО менше $0,27 \text{ мкм}^3$, то оцінюють рівень енергетичного метаболізму як низький, якщо кількість гранул становить 10-15 од., а ЗПО $0,28-0,31 \text{ мкм}^3$ - середній рівень, а якщо кількість гранул сягає більше 15 од. і ЗПО більше $0,31 \text{ мкм}^3$ - як високий.

У відповідності з винаходом для оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарду необхідно оцінити дві групи тварин тих, що знаходились у стані спокою (перша група), та тих, які перенесли фізичне навантаження плаванням (друга група).

Приклад 1 Перша група тварин

Забір біоптату зроблений у 2 тварин, які знаходились у стані спокою. Виготовлення гістологічних препаратів робили за описаною в незалежній частині методикою. Встановлено, що кількість гранул солі тетразолю у 1-го щура - 11 од., ЗПО - $0,28 \text{ мкм}^3$ - рівень енергетичного метаболізму середній, у 2-го щура кількість гранул - 13 од., ЗПО - $0,291 \text{ мкм}^3$ - рівень енергетичного метаболізму середній.

Приклад 2 Друга група тварин

Забір біоптату зроблений у 2 тварин, які були в умовах фізичної напруги на протязі тижня. Виготовлення гістологічних препаратів робили за описаною в незалежній частині методикою.

1-й щур кількість гранул становила 17 од., ЗПО - $0,325 \text{ мкм}^3$. Рівень енергетичного метаболізму оцінений як високий.

2-й щур кількість гранул становила 19 од., ЗПО - $0,34 \text{ мкм}^3$. Рівень енергетичного метаболізму високий.

Рівень енергетичного метаболізму залежить від активності сукцинатдегідрогенази в мітохондріях та питомого об'єму високоенергетичних мітохондрій в міокарді. Ці показники можуть змінюватись в залежності від функціональної активності міокарда. Якщо кількість гранул солі тетразолю, яка утворюється в процесі гістохімічної реакції на СДГ, становить до 10 одиниць, а ЗПО менше $0,27 \text{ мкм}^3$, то оцінюють рівень енергетичного метаболізму як низький, якщо кількість гранул 10-15 од., а ЗПО $0,28-0,31 \text{ мкм}^3$ - рівень середній, а якщо кількість гранул більше 15 од. і ЗПО більше $0,31 \text{ мкм}^3$ - як високий.

Таким чином, після проведення експериментального випробування запропонованого способу визначення енергетичного метаболізму міокарда заявником встановлено, що заявлений спосіб може бути широко використаний у роботі патологоанатомічних відділень та дослідницьких морфологічних і патофізіологічних лабораторій для заявляемого рішення задачі у тому вигляді, як воно охарактеризоване у незалежному пункті формули. Підтверджена можливість його здійснення за допомогою вказаних у заявці, або відомих до дати пріоритету, діагностичних припадів і середовищ. Спосіб, що втілює заявляемий винахід, при здійсненні забезпечує досягнення позитивного результату, а саме визначення енергетичного метаболізму міокарду дає можливість паралельно з гістохімічним проводити морфологічний аналіз зразка тканини.

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

Джерела інформації

1 Спосіб визначення енергетичного метаболізму міокарда. Заяв 95115094 України, МПК А61В10/00 G01N33/48 / Козлов В.О., Твердохліб І.В., Шпонька І.С. (Дніпропетровська державна медична академія) - №22444А - заявл 28.11.95 - опубл. 03.03.98.

2 Черпаченко Н.М., Жданов В.С., Виверт А.М. Изменения активности ферментов миокарда больных дилатационной кардиомиопатией и связь этих показателей с нарушениями сократительной функции миокарда и коронарным атеросклерозом // Арх. пат. - 1992 - Т. 54 - №9 - С. 12-18.

3 Цыпленкова В.Г., Постнов Ю.В. Диагностическая ценность эндомикардиальной биопсии в кардиологической терапевтической клинике // Арх. пат. - 1991 - Т. 53 - №9 - С. 38-43.

4 Карупу В.Я. Электронная микроскопия - К. Вища школа, 1984 - 162с.

5 Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство - М. Медицина, 1990 - 384с.