



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63576 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 8/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЇ ДІАГНОСТИКИ НЕЗВОРОТНОЇ ГІБЕРНАЦІЇ МІОКАРДА ПРИ ІШЕМІЧНІЙ ХВОРОБІ СЕРЦЯ

1

2

(21) u201103778

(22) 29.03.2011

(24) 10.10.2011

(46) 10.10.2011, Бюл.№ 19, 2011 р.

(72) КИЯК ЮЛІАН ГРИГОРОВИЧ, БАРНЕТТ ОЛЬГА ЮЛІАНІВНА, БЕШ ДМИТРО ІГОРОВИЧ, КОВАЛИШИН ВАСИЛЬ ІВАНОВИЧ, КИЯК ГРИГОРІЙ ЮЛІАНОВИЧ

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

(57) Спосіб ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ішемічній хворобі серця, який включає виявлення гранул глікогену в кардіоміоцитах, який **відрізняється** тим, що при виявленні кумуляції та агрегації гранул глікогену у формі розеток (альфа-глікоген) діагностують важку хронічну і незворотну гібернацію кардіоміоцитів, що є підставою для хірургічного втручання.

Корисна модель належить до медицини, зокрема до кардіології, і може застосовуватися для диференційної діагностики між гібернованими, але життєздатними, а також незворотно ураженими кардіоміоцитами (КМЦ), що необхідно для вибору адекватної медикаментозної терапії чи вирішення питання про необхідність ревааскуляризації міокарда у пацієнтів із стенокардією, післяінфарктним кардіосклерозом та гострим інфарктом міокарда.


Відомий спосіб ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ішемічній хворобі серця (ІХС), вибраний як прототип, який включає виявлення дедиференціації, але не важкої дегенерації КМЦ [1].


Недоліком цього способу є те, що він не дозволяє стратифікувати важку та незворотну гібернацію КМЦ.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ІХС з метою оптимізації лікування хворих шляхом введення нових критеріїв незворотного ураження КМЦ.

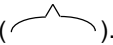
Поставлена задача досягається тим, що спосіб ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ІХС включає виявлення гранул глікогену в КМЦ і, згідно до корисної моделі, при виявленні кумуляції та агрегації гранул глікогену у формі розеток (альфа-глікоген) діагностують важку хронічну і незворотну гібернацію КМЦ, що є підставою для хірургічного втручання.

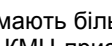

У запропонованому способі додатково виявляють деякі особливості у розташуванні та перерозподілі гранул глікогену. Поява розеток альфа-глікогену, що не є характерним для м'язової тканини міокарда, свідчить про незворотність ураження КМЦ і втрату ними органоспецифічності. Кумуляція і агрегація глікогену у формі розеток (альфа-глікоген) - це показник важкої хронічної і незворотної гібернації КМЦ і є підставою для хірургічного втручання (резекція аневризми серця, вентрикулопластика).

Запропонований винахід ілюструється рисунками, де О - окремо розташовані гранули глікогену (бета-глікоген),  - агреговані гранули (альфа-глікоген), Мф - міофібрили, М - мітохондрії, Я -

ядро,  - саркомери, з ознакою деструкції. На Фіг.1 - електронна мікрофотографія КМЦ білого щура, в саркоплазмі якого окремі гранули (О) глікогену (бета-глікоген) розташовані досить рівномірно між міофібрилами (Мф), навколо мітохондрій (М) і ядра (Я), що є характерним для міокардіальних клітин і свідчить про їх життєздатність. На Фіг.2 - електронна мікрофотографія частини помірно гібернованого КМЦ людини з колорубцевої зони, в саркоплазмі якого теж містяться окремо розташовані гранули β-глікогену (О), які досить рівномірно розподілені між міофібрилами (Мф) і навколо мітохондрій (М), що свідчить про його життєздатність,

UA (11) 63576 (13) U

хоча присутні початкові ознаки гібернації КМЦ, що проявляються деструкцією саркомерів ().

На Фіг. 3 - електронна мікрофотографія частини гібернованого КМЦ із стінки хронічної післяінфарктної аневризми лівого шлуночка пацієнта, де гранули глікогену (альфа-глікоген) переважно зібрані в розетки () і займають більшу частину площі КМЦ. Крім глікогену, в КМЦ присутні залишки Мф і М, що свідчить про їх важку гібернацію, втрату ними органоспецифічності і здатності до скорочення. На Фіг.4 - електронна мікрофотографія частини гепатоцита білого щура, в цитоплазмі якого більшість гранул глікогену (альфа-глікоген) зібрані у типові для печінки розетки ().

Спосіб ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ІХС здійснюють таким чином. Проводять забір міокарда при проведенні операції аорто-коронарного шунтування або вентрикулопластики лівого шлуночка (за Дором) за інформованою згодою пацієнта. Невеликий шматочок тканини (об'єм близько 1 мм³) забирають для дослідження і промивають у какодилатному буфері від крові, а потім поміщають в 2 % розчин OsO₄ на 1 годину для фіксації за методом М. Карновського [2]. Після цього тканину промивають в двох змінах какодилатного буфера. Наступним етапом є зневоднення досліджуваної тканини, що проводиться з використанням етанолу. Зафіксовану тканину послідовно поміщають в різні концентрації етанолу (70, 90, 100 %), а пізніше - у 100 % ацетон за методом В. Weakley [3].

Наступним етапом є просочування тканини смолами. Для цього зафіксований та зневоднений кусочок тканини поміщають в суміш аралдиту та епону на 12 годин при кімнатній температурі. Потім тканину міокарда переносять у свіжу суміш аралдиту та епону (Merk, Німеччина), розливу в капсули, для полімеризації у термостаті протягом 24 годин, при температурі 60 °С. Подальшим етапом є отримання на ультратомі зрізів міокарда, товщиною 1 мкм. Зрізи поміщають на спеціальні металеві сітки і контрастують їх цитратом свинцю за методом Е. Reynolds [4]. Після цього тканина готова для дослідження в електронному мікроскопі. При вивченні тканини проводять фотографування різних ділянок міокарда при різних збільшеннях. В подальшому проводять вивчення фотографій і визначають життєздатність клітин міокарда та зворотність їх гібернації у залежності від наявності різного типу гранул глікогену.

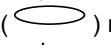
Результативність запропонованої корисної моделі підтверджена проведеними експериментальними дослідженнями (Фіг.1, Фіг.4). В експериментальній частині було взято 5 здорових білих щурів-самців масою 250 г кожен. Зразу після декапітації розтинали грудну і черевну порожнину і проводили забір тканини серця (Фіг.1) та печінки (Фіг.4), які обробляли і фіксували осмієм згідно з вищеописаною методикою. Зразу після забору тканину промивали в какодилатному буфері від крові, а потім поміщали в 2 % розчин OsO₄ на 1 годину для фіксації за методом М. Карновського [2]. Після цього тканину промивали в двох змінах какодилатного буфера. Наступним етапом було


зневоднення досліджуваної тканини з використанням етанолу. Зафіксовану тканину послідовно поміщали в різні концентрації етанолу (70, 90, 100%), а пізніше - у 100 % ацетон за методом В. Weakley [3].

Наступним етапом було просочування тканини смолами. Для цього зафіксований та зневоднений кусочок тканини поміщали в суміш аралдиту та епону на 12 годин при кімнатній температурі. Потім тканину міокарда переносили в свіжу суміш аралдиту та епону (Merk, Німеччина), розливу в капсули, для полімеризації в термостаті протягом 24 годин, при температурі 60 °С. Наступним етапом було отримання на ультратомі зрізів міокарда, товщиною 1 мкм. Їх поміщали на спеціальні металеві сітки і контрастували цитратом свинцю за методом Е. Reynolds [4]. Після цього тканина була готова для дослідження в електронному мікроскопі. При вивченні тканини проводили фотографування різних ділянок міокарда при різних збільшеннях. В подальшому проводився аналіз мікрофотографій.

Для виявлення помірного, а також незворотного ураження гібернованих КМЦ, проведено клінічні та ультраструктурні дослідження і співставлення результатів вивчення біопсій хронічної аневризми серця пацієнта Д. чоловічої статі віком 51 р. Діагноз: Ішемічна хвороба серця. Постінфарктний кардіосклероз. Аневризма передньо-верхівкового сегменту лівого шлуночка. Гіпертонічна хвороба, III стадія, II ступінь. Гіпертензивне серце. Серцева недостатність ПБ стадія, систолічна дисфункція лівого шлуночка (фракція викиду лівого шлуночка 34 %). При проведенні пластики аневризми лівого шлуночка проводили забір кусочків міокарда із стінки хронічної аневризми лівого шлуночка та обробляли його згідно з вищеописаною методикою.

У помірно гібернованих КМЦ людини з колорубцевої зони окремі гранули бета-глікогену розташовані досить рівномірно між міофібрилами, навколо мітохондрій і під сарколемою, що свідчить про життєздатність КМЦ (Фіг. 2).

На відміну від класичних бета-гранул глікогену, що містяться в КМЦ серця білих мишей (Фіг.1), а також в помірно гібернованих, але ультраструктурно збережених КМЦ серця людини (Фіг.2), - у стінці хронічної аневризми серця виявлено КМЦ, що втратили свою кардіоспецифічність (Фіг.3). Вони містять агреговані гранули глікогену (альфа-глікоген) у формі розеток () не властиві для міокарда, а характерні для клітин печінки [5].

Для порівняння виявлених змін в гібернованих КМЦ людини, що втратили органоспецифічність (Фіг.3), наводимо ультраструктурну будову клітин печінки щура (Фіг.4). Забір і фіксація тканини печінки щура були ідентичними з підготовкою до ультраструктурного дослідження біопсійного матеріалу із стінки хронічної аневризми людини. Класично, в гепатоцитах печінки (Фіг.4) глікоген (альфа-глікоген) розташований у формі розеток (). При порівнянні виявленого альфа-глікогену у формі розеток в гібернованих КМЦ людини (Фіг.3) і альфа-глікогену в печінкових клітинах щура (Фіг.4),

- констатовано майже повну ультраструктурну подібність, що підтверджує втрату гібернованими КМЦ людини (із стінки хронічної аневризми серця) органоспецифічності і здатності до скорочення у випадку тривалої і незворотної гібернації.

Виявлено ультраструктурні критерії, які дають можливість діагностувати важку і незворотну гібернацію КМЦ, що має значення для прогнозування перебігу хвороби і дозволяє вибрати оптимальний метод медикаментозного, інвазивного чи хірургічного лікування.

Джерела інформації:

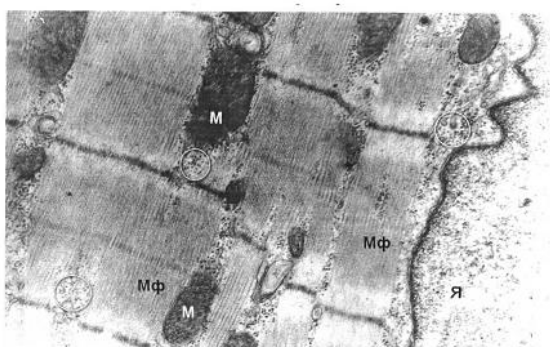
1. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis / G.D. Dispersyn, J. Ausma, F. Thone [et al.] // Cardiovascular Research.-1999.- №43.- P. 947-957.

2. Karnovsky M.J. Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy // Proceeding of the 11th Annual Meeting of the American Society for Cell Biolgy.-1971.-146a.

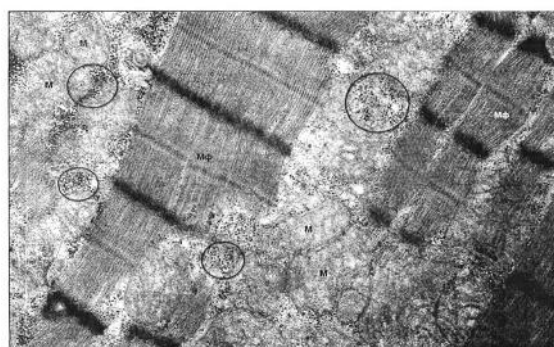
3. Weakley B.S.-A. beginners handbook in biological electron microscopy, -Edinburg; London, -1972.-324 p.

4. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an elektronopaque stain in electron microscopy // Jour. Cell Biol.-1963. - V. 17. - P. 20-212.

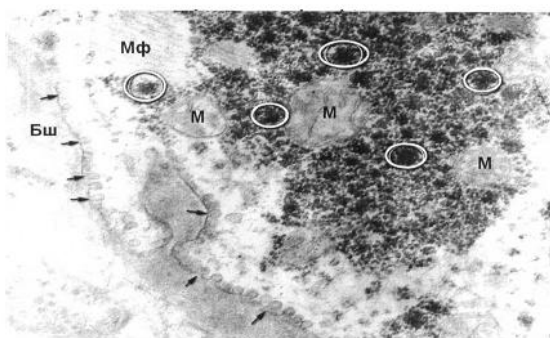
5. Хэм А., Кормак Д. Поджелудочная железа, печень и желчный пузырь / Гистология в пяти томах. Том IV. Пер. с. англ. Москва.-1983. - С. 159-202.



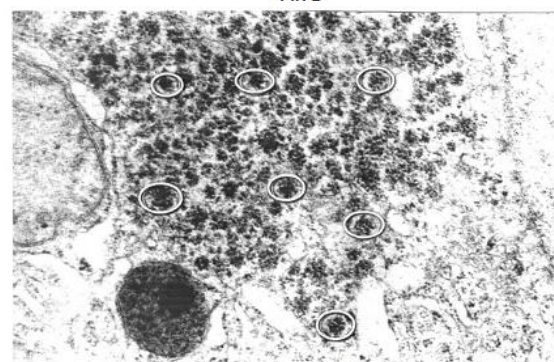
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4