



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **55038** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61B 10/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЕМБРІОНАЛЬНИХ МЕЗЕНХІМНИХ СТРУКТУР**

1

(21) u201001465

(22) 12.02.2010

(24) 10.12.2010

(46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р.

(72) ПОТОЦЬКА ОЛЬГА ЮРІЇВНА, ГОРБУНОВ
АНДРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, МУРАШКІНА ДАР'Я
ГРИГОРІВНА, ДЯГОВЕЦЬ КАТЕРИНА ІВАНІВНА,
СІЛКІНА ЮЛІЯ ВАЛЕРІЇВНА, ТВЕРДОХЛІБ ІГОР
ВОЛОДИМИРОВИЧ(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА
АКАДЕМІЯ(57) 1. Спосіб оцінки морфофункціонального стану
ембріональних мезенхімних структур шляхом
морфометричних досліджень, за яких на цифрову
фотографію стандартного гістологічного зрізу ем-

2

бріона накладають точкову сітку Автанділова, який
відрізняється тим, що: визначають кількісну
щільність ядер мезенхімних клітин, по відхиленню
показника роблять висновки про належність до
відповідної стадії ембріонального розвитку або про
відхилення розвитку в бік затримки чи випере-
дження;

2. Спосіб оцінки морфофункціонального стану ем-
бріональних мезенхімних структур за п. 1, який
відрізняється тим, що при проведенні морфоме-
тричних розрахунків використовується широкодо-
ступне неспеціалізоване програмне забезпечення,
яке дозволяє значно прискорити та стандартизу-
вати процес, відповідно, підвищивши об'єктивність
результатів.

Корисна модель відноситься до медицини та
біології, здебільшого до ембріології та гістології, а
саме до стререометрії гістологічних препаратів, і
може бути використана при морфологічних дослі-
дженнях органів та тканин в ембріології, гістології,
нормальній та патологічній анатомії.

Необхідність стандартизації процесу стадію-
вання ембріонального розвитку досліджуваних
об'єктів була усвідомлена дослідниками досить
давно; так, у 1951 році систему стадіювання роз-
витку ембріонів птахів запропонували В.Гамбургер
та Х.Гамільтон [4]. Оскільки в їх роботі орієнтира-
ми слугували основні системи органів, що не до-
сить зручно для вузьких спеціалістів, виникла пот-
реба більш детального опису кожної системи
окремо із виділенням ключових орієнтирів в її ме-
жах. Так, подібну роботу провів Д. Мартінсен в
галузі серцево-судинної системи [5]. Проте обидві
роботи призначені лише для приблизного визна-
чення етапів розвитку без їх кількісної оцінки, а
отже не дають досліднику можливості виявити
тонкі відхилення у бік затримки чи випередження.

Кількісна оцінка ембріонального розвитку мо-
жлива шляхом обрахування стереометричних па-
раметрів окремих ембріональних структур. Класи-
чний спосіб визначення стереометричних
параметрів мікроскопічних структур передбачає
використання різних окулярних вставок, зокрема
сітки Автанділова [3]. Калібрування вказаних при-
строїв виконують за допомогою об'єкт-мікрометра.
Такий спосіб передбачає використання мікроскопу

та є не достатньо точним, оскільки обчислення
здійснюється дослідником суб'єктивно, та потре-
бує додаткового часу і навичок для виготовлення
та калібрування окулярних вставок.

Останнім часом з метою полегшення процеду-
ри вимірювання мікроскопічних структур було
створено різноманітне програмне забезпечення,
яке пропонує широкий спектр можливостей роботи
з цифровими знімками мікроскопічних структур [6,
2, 1]. Не дивлячись на це, багато з них не дозво-
ляють вимірювати стереометричні параметри [6,
1]. Окрім того спосіб, який пропонується в деяких
програмних забезпеченнях, дозволяє розрахову-
вати стереометричні параметри, шляхом виділе-
ння на зображенні області з різною яскравістю або
кольором фази, виміряти їх та проаналізувати ре-
зультати [2]. Застосування подібної методики не-
можливе для багатьох видів гістологічного забар-
влення. Слід зазначити також, ідо згадане
програмне забезпечення є високоспеціалізованим,
під час не має документації на українській та/або
російській мовах, що викликає певні труднощі із
його придбанням та використанням, особисто для
проведення невеликої кількості вимірів.

Найбільш близьким до корисної моделі, що
пропонується, є спосіб оцінки морфо-
функціонального стану тестикулярної тканини [7].
Спосіб-прототип здійснюється наступним чином:
зображення групи гістологічних препаратів отри-
мують за допомогою цифрового фотоапарата, їх
обробляють за допомогою комп'ютерних програм

(19) **UA** (11) **55038** (13) **U**

[1], а розрахунок стереометричних параметрів проводять із накладанням сітки Автанділова на роздруковані фотознімки. При цьому визначають показники питомої щільності клітин різних типів та структурних елементів тканини. Визначені показники порівнюють із стандартними значеннями та роблять висновок про наявність та характер патологічних змін у тканині.

Недоліками цього способу є обчислення параметрів одразу багатьох тканинних компонентів (10), що є досить клопітким процесом, а також висока суб'єктивність результатів, яка пов'язана з необхідністю диференціювання дослідником вищезгаданих компонентів тканини, що не завжди можливо без використання імуногістохімічних методик (використання яких не доцільне в даному випадку).

В основу корисної моделі, що пропонується, поставлено задачу розробити широкодоступний спосіб оцінки морфо-функціонального стану ембріональних мезенхімних структур, який скорочує час, підвищує точність результату та надає можливість судити про наявність та характер патологічних відхилень. Технічний результат від використання запропонованої моделі полягає в полегшенні методики, зменшенні матеріально-технічних витрат, зменшенні часу, що витрачається на обчислення та підвищенні об'єктивності результатів.

Поставлена задача вирішується тим, що на цифрових знімках мезенхімних структур з допомогою широкодоступного неспеціалізованого програмного забезпечення визначається чисельна щільність ядер мезенхімних клітин та порівнюється із значеннями контролю. Для здійснення даного способу ми обрали і саме мезенхімні структури, оскільки в основі їх утворення лежить динамічний, але строго регульований процес епітеліо-мезенхімної трансформації, тобто постійне новотворення клітин мезенхіми з епітелію. При цьому, оскільки клітини вільно розташовуються в основній речовині, кількість їх ядер (яка додатково залежить від процесів мітозу та синтетичної активності клітин у відношенні продукції позаклітинного матриксу) може бути легко обчислена. Заявлений спосіб здійснюється таким чином:

1. Для аналізу відбирають цифрові фотографії гістологічних зрізів ембріонів, які проходять через центральну вісь симетрії мезенхімної структури. При цьому товщина зрізів має бути не більшою за 7 мкм.

2. Для визначення розмірів фотознімку використовують цифрове зображення об'єкта-мікрометра, отримане на тому самому мікроскопі з допомогою такої ж цифрової фотокамери; з допомогою інструменту «Rule» головної панелі інструментів вимірюють ширину та висоту знімку в мікрометрах (за умови постійного використання однакових технічних пристроїв та збільшення мікроскопа дана процедура проводиться однократно).

3. На цифровому зображенні мезенхімної структури з допомогою лічильника «Count tool» визначають кількість ядер мезенхімних клітин (Fig.1).

4. В команді головного меню «Image» обирають «Image size» та отримане значення ширини (Width) знімку в пікселях ділять на значення ширини фотографії в мікрометрах. Емпіричним шляхом підбирають необхідне значення довжини ребра комірки сітки Автанділова у мікрометрах та множать його на отримане співвідношення, - отримують значення довжини комірки у пікселях.

5. Визначення площі поверхні, яку займає зріз мезенхімної структури, проводять наступним чином: в команді головного меню «Edit» обирають «Preferences→Guides, Grid, Slices & Count» та у команді «Grid every» позначають; потрібну кількість пікселів (визначену у попередньому пункті). У команді уголовного меню обирають «View→Show→Grid» та рахують кількість комірок, сітки, які повністю припадають на досліджувану структуру та половину тих, які припадають частково (наприклад, з правої половини зображення). Отримане значення кількості комірок множать на значення довжини ребра комірки у мікрометрах у квадраті (Fig.2).

6. Отримане значення кількості ядер мезенхімних клітин (з п.3) ділять на значення площі поверхні мезенхімної структури та отримують чисельну щільність ядер мезенхімних клітин, яку порівнюють із даними графіку і визначають приналежність до тієї чи іншої стадії розвитку або характер патологічних відхилень (Fig.3).

Запропонований алгоритм може бути використаний у відношенні таких ембріональних мезенхімних структур як ендокардіальні подушки атріо-вентрикулярного каналу, випускного тракту серця, поперечна перегородка та ін. Окрім того, оскільки процес епітеліо-мезенхімної трансформації лежить в основі виникнення багатьох пухлин, можливо також створення подібних графіків для визначення ступеню їх злоякісності і т.п.

Використання способу визначення морфофункціонального стану ембріональних мезенхімних структур за наведеною схемою дозволяє достатньо легко, швидко і точно встановити навіть незначні відхилення від нормального розвитку. Запропонована корисна модель може бути багаторазово відтворена і використана для стереометрії в ембріології, патологічній анатомії, гістології, анатомії.

Перелік фігур креслення

Додаток

1. Підрахунок кількості ядер (59) мезенхімних клітин на цифровому зображенні гістологічного зрізу проепікарда курячого ембріона кросу Cobb500 на 17 стадії розвитку за Гамбургером та Гамільтоном, 1951.

2. Визначення площі поверхні проепікарда на гістологічному зрізі. Загальну і кількість підрахованих комірок (56) множимо на довжину ребра сітки у квадраті (400), отримують значення площі в мкм (22 400). Отже чисельна щільність ядер мезенхімних клітин, - 0,26341 (1/100мкм²), - знаходиться в межах норми.

3. Динаміка чисельної щільності ядер мезенхімних клітин про епікарда курячого ембріона кросу Cobb500, 1/100мкм².

Джерела інформації

1. ВидеоТест-Размер 5.0 Программное обеспечение для работы с изображениями. Электронный ресурс [http://www.akondmicro.ru/?issue_id=75].

2. ВидеоТест-Морфология 5.0 Программное обеспечение для морфометрического анализа биологических и медицинских изображений. Электронный ресурс [http://www.akondmicro.ru/?issue_id=75]

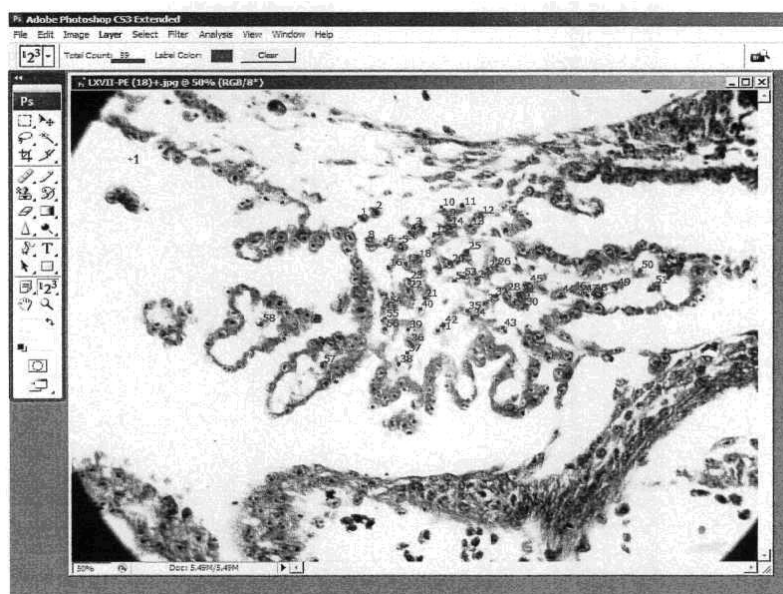
3. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию.- М.: Медицина, 1980.- 216с.

4. Hamburger V.A. series of normal stages in the development of the chick embryo / Viktor Hamburger, Howard L. Hamilton // J. Morphol. - 1951. - Vol.88, №1. - P.49-92.

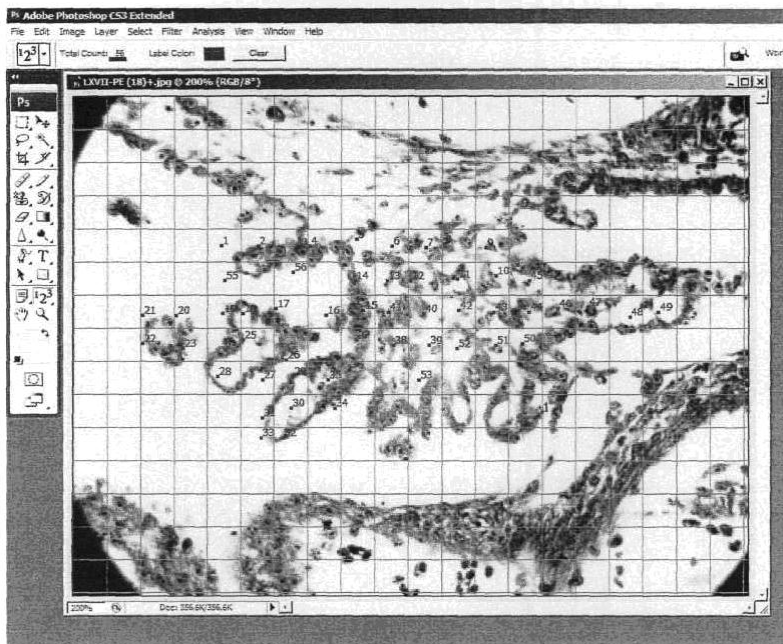
5. Martinsen B.J. Reference guide to the stages of chick heart embryology / Brad J. Martinsen // Developmental dynamics. - 2005. - Vol.233. - P.1217-1237.

6. MetaMorph - image acquisition and analysis software from Molecular Devices. [Электронный ресурс] http://www.moleculardevices.com/pages/MM-new/metamorph_applications.html.

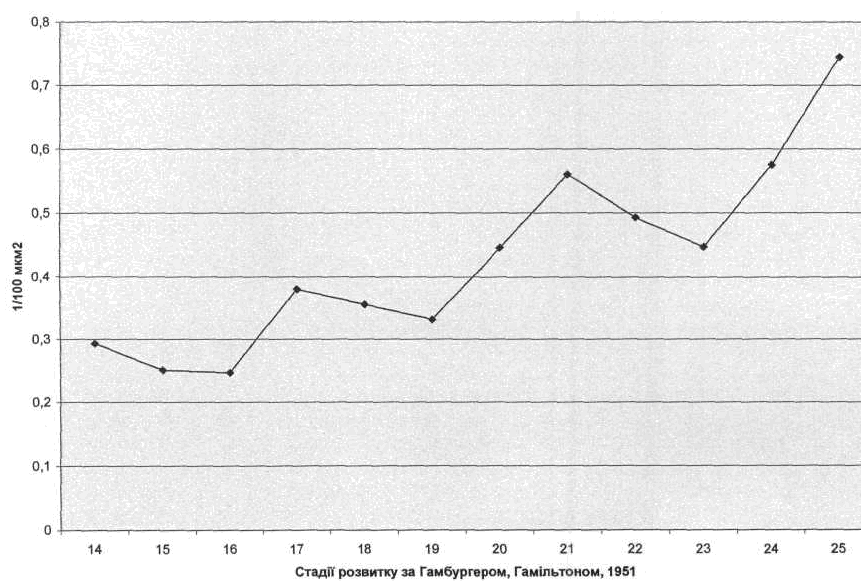
7. Пат. 47118 Україна, МПК А61В10/00. Спосіб оцінки морфо-функціонального стану тестикулярної тканини / Запорожан Валерій Миколайович (UA); Холодкова Олена Леонідівна (UA); Щербатюк Аліна Леонідівна (UA); Пихтєєв Дмитро Михайлович (UA); Одеський державний медичний університет. - №u200911259; заявл. 06.11.2009, опубл. 11.01.2010.



Фиг.1



Фиг.2



Фіг.3