



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99041** (13) **C2**
(51) МПК (2012.01)
G01N 33/483 (2006.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 02081**
(22) Дата подання заявки: **22.02.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.07.2012**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.08.2011, Бюл.№ 16**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2012, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):
**Кияк Юліан Григорович (UA),
Барнетт Ольга Юліанівна (UA),
Беш Дмитро Ігорович (UA),
Ковалишин Василь Іванович (UA),
Кияк Григорій Юліанович (UA)**

(73) Власник(и):
**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО,
вул. Пекарська, 69, м.Львів, 79010 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Dispersyn G. D., Ausma J., Thone F. et al / Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis // Cardiovascular Research. - 1999. - № 43. - P.947-957
RU 2350277 C2, 27.03.2009
Яковлева Л.Н., Шустваль Н.Ф. / Особые состояния миокарда при ишемии // Журнал «Ліки України». - №6 (142). - 2010. - С.22-28 [online] [Знайдений в Internet 26.04.2012]
<http://www.nbuv.gov.ua/portal/chem_biol/liukr/2010_6/10LNYMPI.pdf>
Кияк Ю.Г., Чнгрян Г.В. / Гібернація міокарда у разі гострого інфаркту міокарда: клініко-функціональні прояви та ультраструктурні зміни // Ж.: Кровообіг та гемостаз. - № 3, 2007. - С.33-38 [online] [Знайдений в Internet 26.04.2012]
<http://www.nbuv.gov.ua/portal/chem_biol/kogs/2007_3.pdf>
Dispersyn G. D., Mesotten L., Meuris B., Maes A., Mortelmans L., Flameng W., Ramaekers F. and Borgers M. // Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones // European Heart Journal (2002) 23. - P.849-857 [online] [Знайдено в Internet 27.04.2012]
<<http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/23/11/849.full.pdf>>
Боднар Л.В. / Ультраструктурні зміни провідної системи серця при гострій коронарній недостатності // Буковинський медичний вісник. - Том 12, № 1. - 2008. - С.113-117 [online] [Знайдено в Internet 27.04.2012]
<http://www.nbuv.gov.ua/portal/Chem_Biol/BMV/2008_01/BMV-2008-12-01-113.pdf>

(54) СПОСІБ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЇ ДІАГНОСТИКИ НЕЗВОРОТНОЇ ГІБЕРНАЦІЇ МІОКАРДА ПРИ ІШЕМІЧНІЙ ХВОРОБІ СЕРЦЯ**(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі медицини і стосується способу ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ішемічній хворобі серця. Спосіб включає виявлення гранул глікогену в кардіоміоцитах. При виявленні кумуляції та агрегації гранул глікогену у формі розеток (альфа-глікоген) діагностують важку хронічну і незворотну гібернацію кардіоміоцитів.

UA 99041 C2

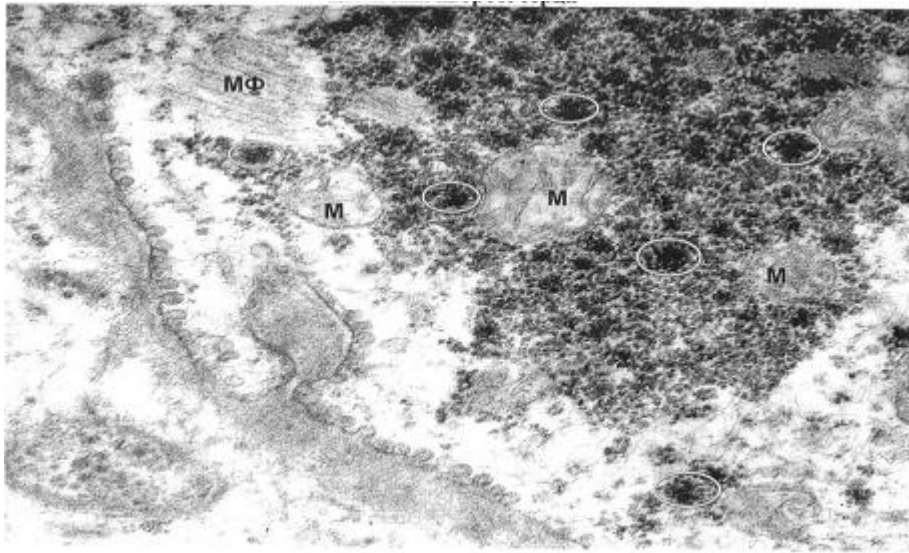


Fig. 3

Винахід 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 реваскуляризації міокарда у пацієнтів із




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



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

В основу винаходу поставлена задача удосконалити спосіб ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ІХС з метою оптимізації лікування хворих шляхом введення нових критеріїв незворотного ураження КМЦ.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ІХС, який включає виявлення гранул глікогену в КМЦ, згідно з винаходом, при виявленні кумуляції та агрегації гранул глікогену у формі розеток (альфа-глікоген) діагностують важку хронічну і незворотну гібернацію КМЦ (феномен опечінкування гібернованих 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 (феномен опечінкування). 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 ядер (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 бета-глікогену (О), які досить рівномірно розподілені між міофібрилами (МФ) і навколо мітохондрій (М), що свідчить про його життєздатність, 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 незворотної 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].

Подальшим 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. Наступним 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 запропонованого винаходу 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 порожнини 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 OsO_4 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].

Подальшим 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 °C. 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 ІІБ стадія, систолічна дисфункція лівого шлуночка (фракція викиду 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]. Тому цей стан гібернації КМЦ можна назвати феноменом опечінкування.

Для порівняння виявлених змін в гібернованих КМЦ людини, що втратили органоспецифічність і набули феномену опечінкування (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 (опечінкування), 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.

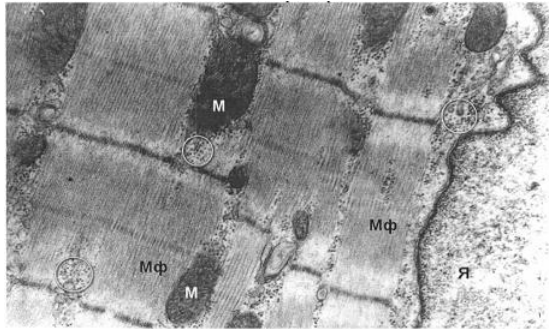
5. Хэм А., Кормак Д. Поджелудочная железа, печень и желчный пузырь / Гистология в пяти томах. Том IV. Пер. с англ. - Москва.-1983. - С. 159-202.

5

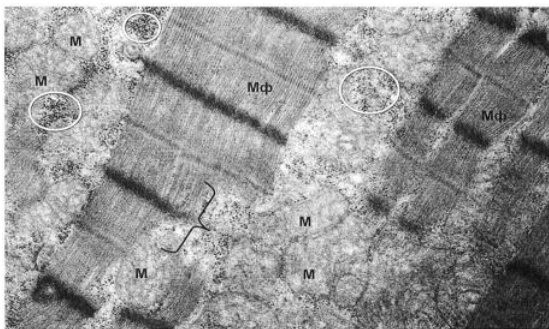
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб ультраструктурної діагностики гібернації міокарда при ішемічній хворобі серця, який включає виявлення гранул глікогену в кардіоміocyтах, який **відрізняється** тим, що при виявленні кумуляції та агрегації гранул глікогену у формі розеток діагностують важку хронічну і незворотну гібернацію кардіоміocyтів.

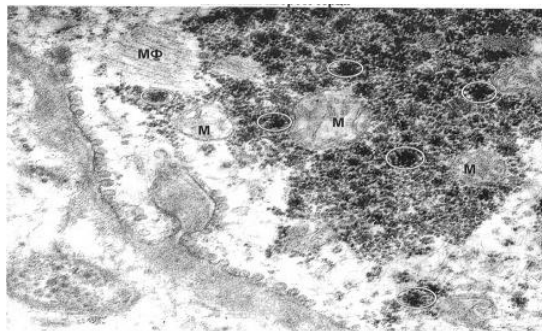
10



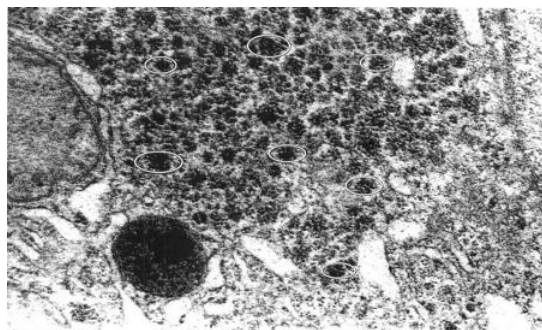
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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