



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 90740

(13) U

(51) МПК

G01N 33/483 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 15109**

(22) Дата подання заявки: **23.12.2013**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.06.2014**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.06.2014, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Кияк Юліан Григорович (UA),  
Ковалишин Василь Іванович (UA),  
Барнетт Ольга Юліанівна (UA),  
Кияк Григорій Юліанович (UA)**

(73) Власник(и):

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

## (54) СПОСІБ ГІСТОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГІБЕРНАЦІЇ КАРДІОМІОЦИТІВ ПРИ ІШЕМІЧНІЙ ХВОРОБІ СЕРЦЯ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики гібернації кардіоміоцитів при ішемічній хворобі серця включає використання біоптатів і експрес-некроптів міокарда. За допомогою світлооптичної мікроскопії із застосуванням гістохімічної ШИК-реакції досліджують напівтонкі зрізи із під час операційних біоптатів або експрес-некроптів міокарда при ішемічній хворобі серця і при виявленні позитивної ШИК-реакції (рожеве забарвлення саркоплазми) діагностують гібернацію кардіоміоцитів.

UA 90740 U



Корисна модель належить до медицини, зокрема до кардіології, і може застосовуватись в патолого-анатомічних лабораторіях для виявлення гібернації міокарда як ознаки важкої вуглеводної дистрофії, котра свідчить про значне зниження функціональної здатності кардіоміоцитів і є передвісником їх загибелі шляхом апоптозу, некрозу або кальцифікації.

Відомий спосіб ультраструктурної діагностики гібернації кардіоміоцитів при ішемічній хворобі серця (ІХС) людини, за яким проводять електронно-мікроскопічні дослідження біоптатів і експрес-некропатів міокарда [1]. Такий метод є складний та дороговартісний, відтак недоступний для використання у переважній більшості патологоанатомічних лабораторій.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб гістологічної діагностики гібернації кардіоміоцитів при ІХС із застосуванням гістохімічної ШИК-реакції, що дозволить в умовах патологоанатомічних лабораторій діагностувати гібернацію міокарда, в основі якої лежить важка вуглеводна дистрофія кардіоміоцитів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі діагностики гібернації кардіоміоцитів при ішемічній хворобі серця, що включає використання біоптатів і експрес-некропатів міокарда, згідно з корисною моделлю, за допомогою світлооптичної мікроскопії із застосуванням гістохімічної ШИК-реакції досліджують напівтонкі зрізи із під час операційних біоптатів або експрес-некропатів міокарда при ІХС і при виявленні позитивної ШИК-реакції (рожеве забарвлення саркоплазми) діагностують гібернацію кардіоміоцитів.

Запропонована корисна модель створює можливість гістохімічної діагностики гібернації кардіоміоцитів при ішемічній хворобі серця людини на світлооптичному рівні при використанні біоптатів і експрес-некропатів міокарда та застосуванні ШИК-реакції.

За даними трансмісійної електронної мікроскопії у експериментальних здорових тварин кардіоміоцити, а також поперечно-смугасті скелетні м'язові волокна вміщують незначну кількість поодинокі розташованих гранул  $\beta$ -глікогену в саркоплазмі [2]. У той час, як у кардіоміоцитах людини при ІХС ультраструктурно іноді виявляють значні скупчення гранул  $\beta$ -глікогену [3,4]. У випадках кумуляції і агрегації гранул глікогену в формі розеток ( $\alpha$ -глікоген), характерних для печінки, діагностують важку, хронічну і незворотну гібернацію кардіоміоцитів [1], що призводить до втрати ними органоспецифічності і виникнення "гепатизації" цих клітин [2].

Встановлено, що для діагностики гібернації кардіоміоцитів, яка представляє собою вуглеводну дистрофію (нагромадження гранул  $\beta$ - або  $\alpha$ -глікогену у місцях деструкції саркоплазми), можна застосувати ШИК-реакцію, хоча "золотим стандартом" для її діагностики є електронно-мікроскопічне дослідження. Дотепер позитивну гістохімічну реакцію на зрізах печінки [5], м'язової тканини [6], міокарда [7] та шкіри [8] при проведенні ШИК-реакції (поява червоно-рожевого забарвлення цитоплазми клітин) пов'язують із присутністю в клітинах полісахаридів, а не безпосередньо глікогену. Відтак, досі не йшла мова про діагностику гібернації кардіоміоцитів, основним проявом якої є кумуляція глікогену в саркоплазмі.

ШИК-реакція дає змогу виявити депозити гранул глікогену навіть у кардіоміоцитах, зафіксованих у 2 % розчині  $\text{OsO}_4$  і залитих у суміш смол епону та аралдиту (після відповідної підготовки зрізів міокарда для світлооптичного дослідження). У випадку виходу гранул глікогену в інтерстицій ШИК-реакція дає змогу констатувати некроз кардіоміоцитів на основі червоно-рожевого забарвлення строми міокарда.

Опис корисної моделі супроводжується ілюстраціями. На Фіг. 1 представлена світлова мікроскопія міокарда білого щура, яка відображає позитивну ШИК реакцію у саркоплазмі кардіоміоцитів (слабо інтенсивне червоно-рожеве забарвлення саркоплазми, де міститься незначна кількість гранул  $\beta$ -глікогену (O); домінування ознак ШИК-позитивних вуглеводовмісних сполук у переваскулярному просторі( $\rightarrow$ ); масштабна лінійка: 25 мкм. На Фіг. 2 зображена світлова мікроскопія печінки білого щура: різко позитивна ШИК реакція (O) (червоно-рожеве забарвлення вуглеводовмісних компонентів цитоплазми) свідчить про наявність розеток  $\alpha$ -глікогену, характерних для гепатоцитів; масштабна лінійка: 25 мкм. На Фіг. 3 представлена світлова мікроскопія гібернованого міокарда (колоінфарктна ділянка); позитивна ШИК-реакція (інтенсивне червоно-рожеве забарвлення) відображає кумуляцію вуглеводовмісних компонентів, зокрема глікогену (O), в гібернованих і некротично змінених кардіоміоцитах та в інтерстиції; Л-ліпідна крапля; масштабна лінійка: 25 мкм. На Фіг. 4 зображена електронна мікрофотографія гіпертрофованого і гібернованого кардіоміоциту; масивні депозити гранул глікогену у центральній частині клітини (O), а також їх присутність між саркомерами і навколо мітохондрій (M); масштабна лінійка: 2,2 мкм. На Фіг. 5 представлена електронна мікрофотографія гібернованого і некротично зміненого кардіоміоциту, розташованого на периферії хронічної післяінфарктної аневризми лівого шлуночка (2 місяці після перенесеного інфаркту міокарда); масивні депозити гранул глікогену в гібернованому кардіоміоциті (O) з

ознаками його некрозу; наявність глікогену в позаклітинному просторі у результаті лізису сарколеми кардіоміоциту ( $\rightarrow$ ); масштабна лінійка: 3,3 мкм.

Спосіб здійснюють таким чином. За допомогою світлооптичної мікроскопії із застосуванням ШИК-реакції досліджують напівтонкі зрізи міокарда і при виявленні кумуляції глікогену в саркоплазмі діагностують гібернацію кардіоміоцитів.

Для підтвердження специфічності ШИК-реакції у виявленні гібернації міокарда, яка представляє собою вуглеводну дистрофію клітин, були проведені клініко-експериментальні дослідження.

Із під час операційних біоптатів, а також експрес-некропатів міокарда при ІХС, зафіксованих у 2 % розчині  $\text{OsO}_4$  на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,36) і залитих у суміш смол епону та аралдиту [9] виготовляли напівтонкі зрізи на ультрамикротомі УМТП-3М. Для забезпечення кращої проникності періодної кислоти та реактиву Шиффа [10] до гранул глікогену у зафіксованих осмієм блоках міокарда, зрізи тканини спочатку обробляли 1 год. о-ксилолом, після чого їх зневоднювали в етиловому спирті (низхідних концентрацій) і промивали дистильованою водою [11]. Висушені зрізи витримували ще 20 хв. у розчині цитрату свинцю, приготованому за методикою Reynolds E.S. [12]. У подальшому їх промивали у дистильованій воді. На напівтонких зрізах міокарда, оброблених за вищевказаною методикою, проводили реакцію з періодною кислотою та реактивом Шиффа (ШИК-реакція) упродовж 30 хв [13]. Паралельно проводили контрольні дослідження ШИК-реакції у напівтонких зрізах печінки і міокарда лівого шлуночка білих щурів, попередньо зафіксованих у 2 % розчині  $\text{OsO}_4$  на 0,1 М фосфатному буфері та залитих у суміш смол епону та аралдиту, аналогічно до біопсій та некропатів. Після проведення ШИК-реакції, напівтонкі зрізи міокарда вивчали і фотографували у світлооптичному мікроскопі МБИ-1, обладнаному цифровою фотокамерою OLYMPUS FE-210/X-775. Паралельно ультратонкі зрізи міокарда людини, проконтрастовані в розчинах солей урану і свинцю, вивчали і фотографували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа.

При світлооптичному аналізі контрольних зразків міокарда щурів нами було виявлено, що ШИК-реакція була слабо позитивна в усіх випадках і проявлялася червоно-рожевим забарвленням поодиноких гранул глікогену в саркоплазмі кардіоміоцитів, а також стромі міокарда навколо мікросудин (Фіг. 1). У гепатоцитах червоно-рожеве забарвлення було значно інтенсивнішим, відображаючи наявність великої кількості розеток а-глікогену в цитоплазмі цих клітин (Фіг. 2).

Світлооптичне дослідження напівтонких зрізів гібернованого міокарда при ІХС засвідчив, що ШИК-реакція у найбільшій мірі проявилася у кардіоміоцитах, зосереджених у суміжних ділянках із вогнищами некрозу і рубцювання (Фіг. 3), ультраструктурно в яких було виявлено депозити глікогену (Фіг. 4). Гіберновані кардіоміоцити мали інтенсивне червоно-рожеве забарвлення, відображаючи скупчення значної кількості глікогену в саркоплазмі (Фіг. 3). Як відомо, кумуляція гранул глікогену у ділянках деструкції саркоплазми є надійнішим доказом гібернації цих клітин [2], що було підтверджено електронно-мікроскопічно (Фіг. 4).

Значні скупчення гранул глікогену виявлено і в стромі міокарда, що було зумовлено руйнуванням (некрозом) гібернованих кардіоміоцитів. Лізис сарколеми кардіоміоцитів призводив до появи як поодиноких гранул, так і компактних мас глікогену у позаклітинному просторі (Фіг. 5).

Інтактні кардіоміоцити, які містили поодинокі гранули  $\beta$ -глікогену, були ШИК-негативними, тобто не набували червоно-рожевого забарвлення. Необхідно зазначити, що кардіоміоцити, які зазнали гострої ішемії або посмертного автолізу, втрачали гранули глікогену, і за цих обставин, згідно з нашим дослідженням, ШИК-реакція була негативною.

Ультраструктурні дослідження міокарда підтвердили відповідність позитивної ШИК-реакції (червоно-рожеве забарвлення), виявленої на світлооптичному рівні, депозитам гранул глікогену в кардіоміоцитах та в інтерстиції при ІХС.

Джерела інформації:

1. Барнетт О.Ю., Кияк Ю.Г., Кияк Г.Ю., Ковалишин В.І., Беш Д.І. Гібернація міокарда у хворих на артеріальну гіпертензію та ішемічну хворобу серця як причина серцевої недостатності // Львівський клінічний вісник. - 2013. - № 2(2). - С. 18-22.

2. Electron microscopic atlas of cell, tissues organs in the internet. [www.drjastrow.de](http://www.drjastrow.de). Дата останнього оновлення: 2013. - Дата останнього доступу: 2013.

3. Кияк Ю.Г. Ремоделювання, гібернація і апоптоз кардіоміоцитів при артеріальній гіпертензії та інфаркті як предиктор серцевої недостатності / Ю.Г. Кияк, О.Ю. Барнетт // Ліки України. - 2011. - № 2(6). - С. 27-34.

4. Su X, Sekuguchi M, Endo M An ultrastructural study of cardiac myocytes in postmyocardial infarction ventricular aneurism representative of chronic ischemic myocardium using semiquantitative

and quantitative assessment. Cardiovascular Pathology. 2000, 9 (1), 1-8. Пат. № 99041 Україна, G01N 33/483, A61B 10/00. Спосіб ультраструктурної діагностики незворотної гібернації міокарда при ішемічній хворобі серця / Кияк Ю.Г., Барнетт О.Ю., Беш Д.І., Ковалишин В.І., Кияк Г.Ю.; заявник і патентовласник Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. - № а201102081; заявл. 22.02.2011; опубл. 25.08.2011, Бюл. № 16.

5 5. Ulusoy E., Eren B. Histological changes on liver glycogen storage in mice (*Mus musculus*) caused by unbalanced diets. Clin Med: Pathology 2008, 1, 69-75.

6. Hotchkiss R.D. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem, 1948, 16, 131-141.

10 7. Ausmaa J., Coumansa W.A., Duimelb H. Atrial high energy phosphate content and mitochondrial enzyme activity during chronic atrial fibrillation. Cardiovascular Research, 2000, 47, 788-796.

8. Stoughton R., Wells G. A. histochemical study on polysaccharides in normal and diseased skin. J of investigative dermatology, 1950, 14, 37-51.

15 9. Glauert A.: Practical Methods in electron microscopy. American Elsevier, North Holland 1975.

10. De Tomasi J.A. Improving the technic of the Feulgen stain. Stain Technology, 1936, 11, 137-144.

11. Уикли Б. Електронная микроскопия для начинающих. - М.: Мир; 1975.

20 12. Reynolds ES The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J Cell Biol, 1963, 17, 208-212.

13. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. - Будапешт: Издательство академии наук Венгрии, 1962.- С. 176-180, 196.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

25 Спосіб діагностики гібернації кардіоміоцитів при ішемічній хворобі серця, що включає використання біоптатів і експрес-некроптів міокарда, який **відрізняється** тим, що за допомогою світлооптичної мікроскопії із застосуванням гістохімічної ШИК-реакції досліджують напівтонкі зрізи із під час операційних біоптатів або експрес-некроптів міокарда при ішемічній

30 хворобі серця і при виявленні позитивної ШИК-реакції (рожеве забарвлення саркоплазми) діагностують гібернацію кардіоміоцитів.

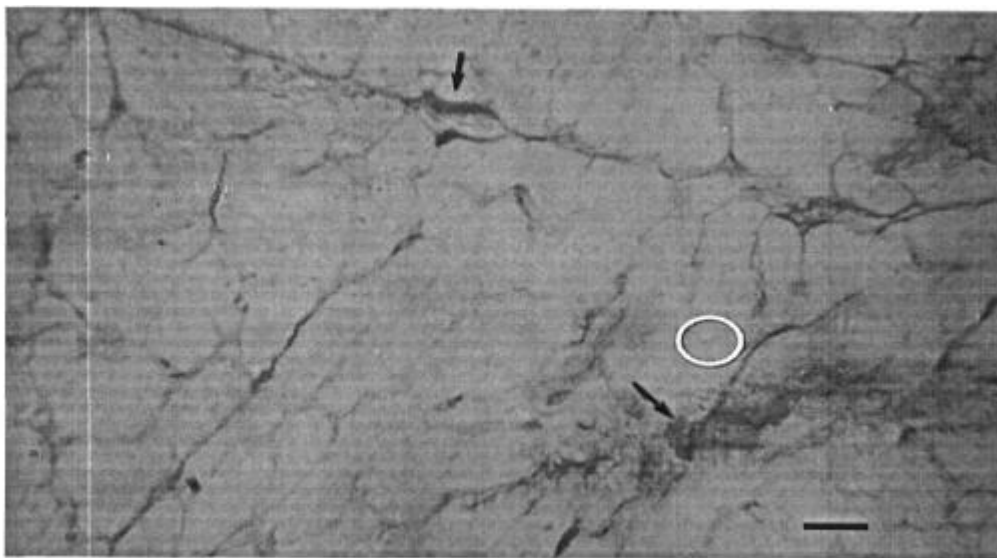


Fig. 1

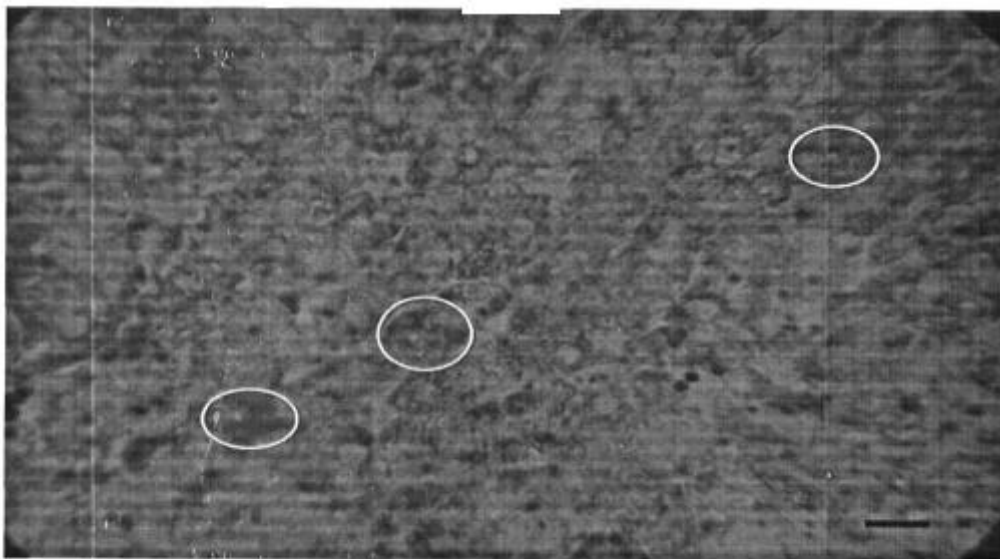


Fig. 2

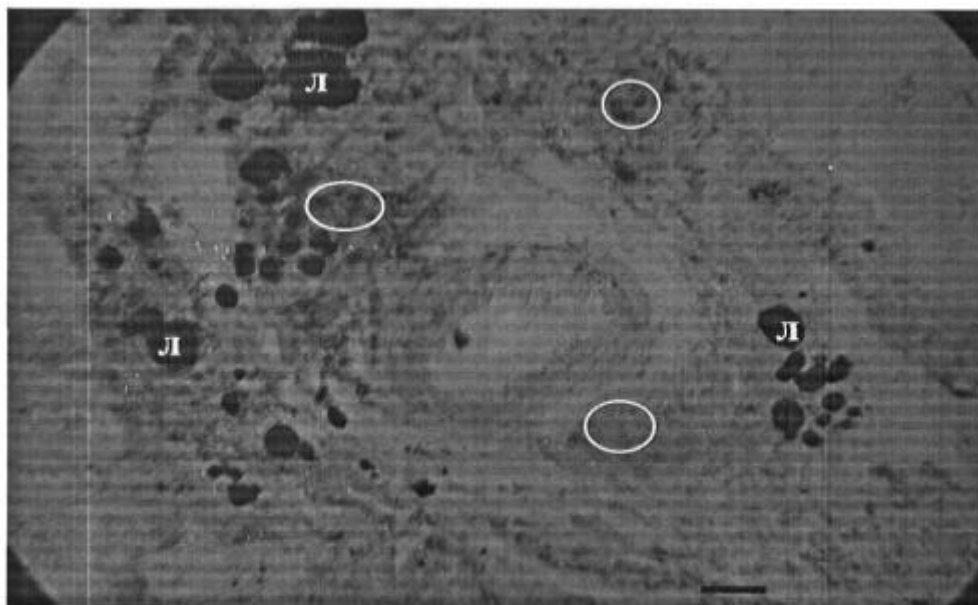


Fig. 3

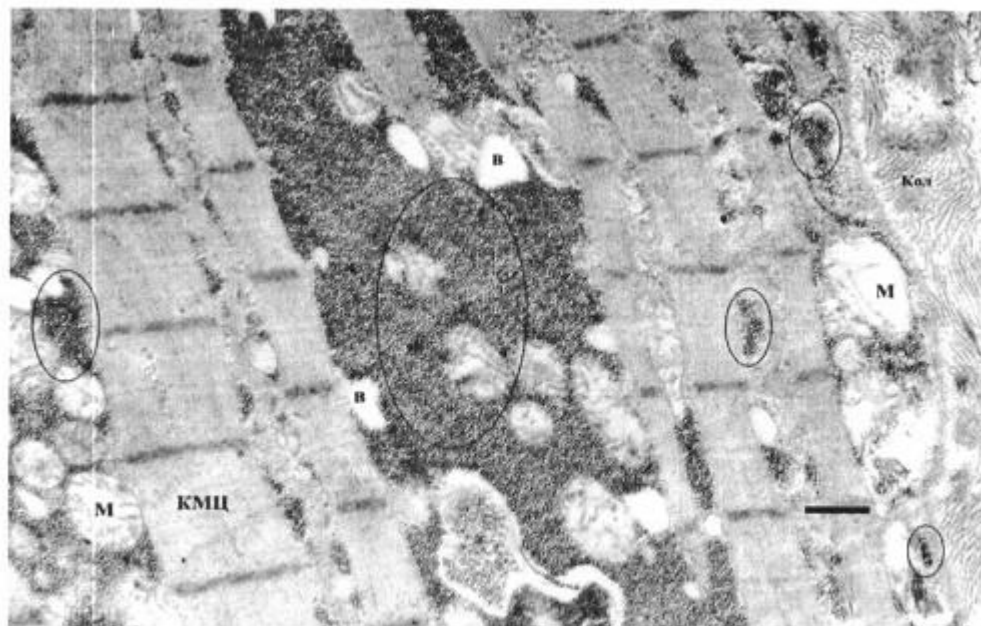


Fig. 4

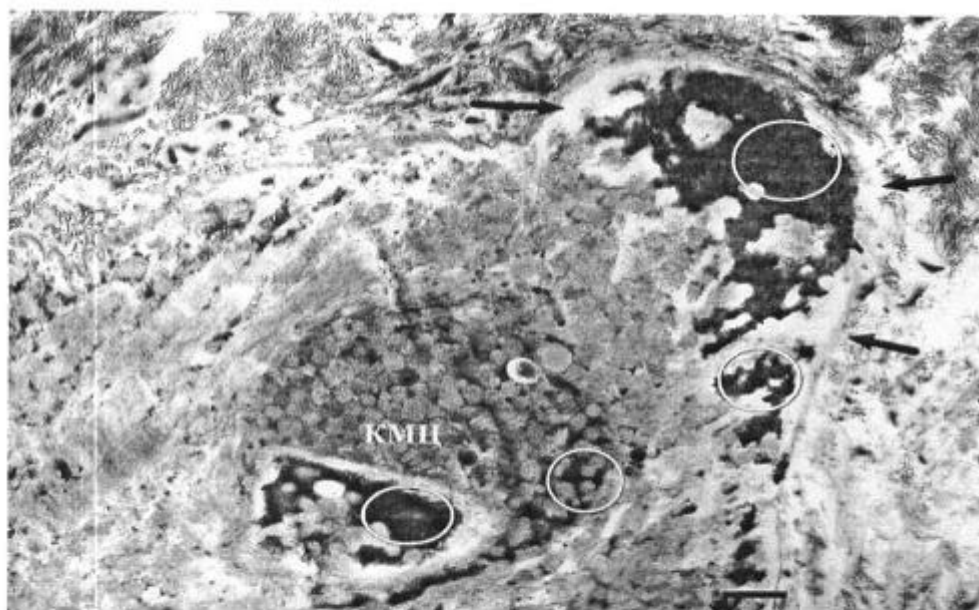


Fig. 5

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

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