



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37790 (13) U

(51) МПК (2006)

G01N 21/76

G01N 33/483

G01N 29/06

A61B 5/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ СТРУКТУР ХОРІАЛЬНОГО ДЕРЕВА ПЛАЦЕНТИ ЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ НАНОЧАСТИНОК НАПІВМАГНІТНОГО НАПІВПРОВІДНИКА

1

2

(21) u200808402

(22) 23.06.2008

(24) 10.12.2008

(46) 10.12.2008, Бюл.№ 23, 2008 р.

(72) САВЧУК АНДРІЙ ЙОСИПОВИЧ, UA, ФЕДІВ ВОЛОДИМИР ІВАНОВИЧ, UA, ДАВИДЕНКО ІГОР СВЯТОСЛАВОВИЧ, UA, ФЕДІВ ОЛЕКСАНДР ІВАНОВИЧ, UA, САВЧУК ТЕТЯНА АНДРІЇВНА, UA

(73) БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ МОЗ УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб візуалізації структур хоріального дерева плаценти люмінесцентним методом шляхом

реєстрації люмінесцентного сигналу біосенсорів у тканині, який **відрізняється** тим, що як біосенсор використовують синтезовані біосенсорні системи - наночастинки напівмагнітного напівпровідника Cd_{1-x}Mn_xS - меркаптоетанол, які наносять на досліджувані зрізи тканини, після чого реєструють люмінесцентний сигнал адсорбованого біосенсора при опроміненні в діапазоні 400-440нм із селективним виявленням структур хоріального дерева плаценти.

Корисна модель відноситься до галузі фізики напівпровідників і наноструктур та медицини, а саме до фізики напівпровідників і наноструктур, гістології, цитології, ембріології, патологічної анатомії, судової медицини та може бути використана для морфологічної оцінки функціонального стану структур хоріального дерева плаценти на основі об'єктивної оцінки люмінесцентної візуалізації цих структур як в нормі, так і при патології.

Аналогом корисної моделі є найпоширеніша в гістологічній практиці методика забарвлення гістологічних зрізів плаценти гематоксиліном і еозином [Venerucci F. Histopathology kits: methods and applications. - Bologna, Milan: Bio-Optica. - 2001.- 95p.]. Опис методики. Гістологічний зріз занурюють у фарбуючий розчин гематоксиліну, тривалість експозиції - (5-10)хв. Промивка у проточній або дистильованій воді - (2-3)хв. Диференціювання в 1% розчині солянокислого спирту і визначається досвідом лаборанта. Відновлення у воді з рН=7.4-7.8 протягом 10-20 хвилин. Фарбування у фарбуючому розчині еозину - (1-2)хв. Промивка у дистильованій воді. Для візуалізації структур використовується метод оптичної мікроскопії.

Недоліком аналога є багатоступеневість методики, необхідність певних навиків у лаборанта

при процедурі диференціювання, селективність структур проявляється тільки у візуалізації їх чітких анатомічних контурів.

Найближчий аналог корисної моделі є спосіб візуалізації структур біологічних тканин люмінесцентним методом шляхом реєстрації люмінесцентного сигналу біосенсорів у тканині, що досліджується [В.А. Олейников, А.В. Суханова, И.Р. Набиев Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине / ж. Российские нанотехнологии.- Т.2, №1-2. - 2007. - С.160-173]. Як біосенсори використовують органічні фотолюмінесцентні барвники. Дослідження найближчого аналога структур хоріального дерева плаценти невідомі.

Недоліками найближчого аналога є:

- відсутність методик досліджень на фіксованих тканинах плаценти;
- незначна фотостабільність;
- вузький спектр збудження;
- відсутність можливості регулювати спектр випромінювання;
- зміна фотолюмінесцентних властивостей барвника під впливом зовнішніх факторів (тип середовища, рН середовища, близькість розташування

UA (19) 37790 (13) U

молекул барвника між собою, що може призводити до зменшення люмінесцентного сигналу).

Нами пропонується рішення, що усуває зазначені недоліки.

В основу корисної моделі поставлене завдання удосконалити спосіб візуалізації структур хоріального дерева плаценти люмінесцентним методом із допомогою селективного адсорбування біосенсорної системи на базі напівпровідникової наночастинки до адсорбуючих молекул досліджуваних структур, що забезпечує підвищення точності та фотостабільності.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі візуалізації структур хоріального дерева плаценти люмінесцентним методом шляхом реєстрації люмінесцентного сигналу від біосенсорів у тканині, згідно з корисною моделлю як біосенсор використовують синтезовані біосенсорні системи -

наночастинка напівмагнітного напівпровідника $Cd_{1-x}Mn_xS$ - меркаптоетанол, - які наносяться на досліджувані зрізи тканини, після чого реєструють люмінесцентний сигнал адсорбованого біосенсора при опроміненні в діапазоні 400-440нм із селективним виявленням структур хоріального дерева плаценти.

Спільними ознаками найближчого аналога та способу, що заявляється, є візуалізація досліджуваних структур люмінесцентним методом. Корисна модель відрізняється від найближчого аналога тим, що джерелом люмінесцентного сигналу є наночастинки напівмагнітного напівпровідника $Cd_{1-x}Mn_xS$, які наділені функціональними перевагами, спрощується методика обробки зрізів.

Порівняння способу, що заявляється, та способу-найближчого аналога, подано у таблиці.

Таблиця

Ознака	Спосіб люмінесцентної реєстрації біологічних об'єктів (найближчий аналог)	Спосіб люмінесцентної візуалізації структур біологічних тканин (спосіб, що заявляється)
Дослідження структур хоріального дерева плаценти	відсутнє	є
Тип джерела люмінесцентного сигналу	Органічна молекула	Трьохкомпонентна напівпровідникова наночастинка
Характеристики люмінесцентного сигналу		
а) спектр збудження	вузький	широкий
б) фото стабільність	слабка	значна
в) можливість регулювати емісійним спектром	відсутня	складом, розмірами наночастинок

Теоретичне підґрунтя для використання способу.

Неорганічні наночастинки є важливими складовими для утворення різноманітних функціональних надструктур. Розміри їх можуть складати від одиниць до сотень нанометрів. Вони наділені багатьма специфічними оптичними й електронними властивостями, які залежать від їх розмірів, форми, складу та мають передбачуваний характер.

Розміри субклітинних структур співрозмірні з розмірами наночастинок, що спонукає до використання їх як нанозондів, які дозволяють проводити дослідження на клітинному рівні.

Одним із чутливих методів дослідження біологічних об'єктів є флюоресцентний аналіз. Дослідження показали, що напівпровідникові квантові точки мають значні переваги над стандартними фарбуючими речовинами: збуджуються широким спектром довжин хвиль, що дозволяє при одному джерелі збудження отримувати різні спектри випромінювання; наділені значною фотостабільністю; їх спектри випромінювання, які регулюються розміром і складом наночастинок, є вузькими та симетричними; мають мінімальну інтерференцію від натуральних автофлюоресцентних частинок [Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection / Nature Biotechnology. - 2004. - V.22. - p.47-52, X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, and S. Weiss Quantum Dots for Live

Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics / Science. 2005 January 28; 307(5709): 538-544].

Використання напівпровідникових наночастинок у візуалізації біологічних об'єктів має обмеження, що пов'язано з отриманням біосумісних нанокристалів. Зокрема, різка зміна умов часто призводить до деградації та дезактивації чутливих біологічних компонентів, і обмінні реакції на поверхні наночастинок часто утруднюють формування стабільних біокон'югатів, змінюють хімічний та фізичний стан поверхневих атомів наночастинок, що в багатьох випадках зменшує квантовий вихід люмінесценції наночастинок, а також призводить до перетворень, які сприяють їх агрегації та осадженню [Christof M. Niemeyer Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science / Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 4128-4158]. Спосіб, що заявляється, здійснюється наступним чином. Метод обробки тканин перед нанесенням біосенсорів полягає у наступному. Застосований спосіб обробки тканини, який мінімально змінює її хімічні та структурні властивості, зокрема, дозволяє зберегти придатними для виявлення більшість антигенів [Эллиниди В.Н., Анисеева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистоцитохимия (методические рекомендации). - СПб. - 2002. - 38с.] і сульфгідрильних груп білкових молекул з можливістю їх тривалої консервації у парафінових блоках. Основні принципи зазначеного способу обробки тканини полягають

у: 1) фіксації тканини у забуференому (рН=7,0) фосфатним буфером за Ліллі 10%-му розчині формаліну впродовж 22 годин (триваліший час обробки у формаліні призводить до артефактів структури більшості антигенів), 2) прискореному зневодненні у висхідній батареї спиртів, 3) просочуванні у парафіні при температурі 58°C (вищі значення температури можуть викликати небажані зміни структури антигенів). Гістологічні зрізи 5 мкм завтовшки отримували за допомогою санного мікротому МС-2.

Нанесення біосенсорів на гістологічний зріз проводять наступним чином. Гістологічний зріз повністю покривають колоїдом із наночастинок. Тривалість експозиції в межах 5-10хв. Після експозиції гістологічний зріз промивають дистильованою водою, просушують.

Фотолюмінесцентні дослідження оброблених гістологічних зрізів виконують з використанням мікроскопа ЛЮМАМ-Р-8, цифрової фотокамери Olympus C740UZ, люмінесцентного об'єктиву Л40^x.

Приклад практичного використання способу.

З використанням способу, який заявляється як корисна модель, було проведено дослідження гістологічних препаратів плаценти людини терміном вагітності 40 тижнів. Найінтенсивніше світіння відзначалося в еритроцитах плода та матері й в інтервільозному (міжворсинчастому) фібриноїді. Дещо менш інтенсивне, але все ж чітке світіння, спостерігалось в синцитіотрофобласті та ендотеліоцитах кровоносних судин хоріальних ворсин. Найменш інтенсивне світіння зафіксовано у дрібних об'єктах строми хоріальних ворсин, які з урахуванням розмірів, форми та особливостей розташування ідентифіковані як стромальні клітини (найвірогідніше, з урахуванням терміну вагітності, - фібробласти). Спектральний діапазон зображення знаходився в області зеленого кольору (біля 500нм).

Експерименти з цифровою фотозйомкою люмінесцентних зображень при різних витримках (за інших рівних умов експозиції) дозволили виявити, що світіння еритроцитів зумовлено світінням їх оболонки, а сприйняття того, що світиться еритроцитарна цитоплазма, є наслідком розсіювання світла.

В інтервільозному фібриноїді відзначено світіння різної інтенсивності, що особливо яскраво простежувалося у так званому каналізованому фібриноїді. Найінтенсивніше світилися ділянки, де, за імуногістохімічними даними зазвичай концентруються адгезивні молекули, зокрема, інтегрин- α -X- β 2 (CD11c / CD18) [Давиденко І.С. Експресія CD11c в структурах плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // Буковинський медичний вісник. - 2004. - Т.8, №3-4.- С.155-158.]. Поверхня

фібриноїду та внутрішня вистилка його поліморфних каналів, де визначалася тонка світла смужка з високою інтенсивністю світіння, яке відрізнялося за спектром від інших ділянок фібриноїду - мало жовто-золотисте забарвлення. Для усунення суб'єктивності в оцінці кольору забарвлення здійснено спектральний комп'ютерний аналіз ділянок зображення у системи RGB. Аналогічне світіння у вигляді тонкої смужки відзначалося і на поверхні синцитіотрофобласта, що також відповідає імуногістохімічному розташуванню інтегрину- α -X- β 2 [Давиденко І.С. Експресія CD11c в структурах плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // Буковинський медичний вісник. - 2004. - Т.8, №3-4. - С.155-158.].

Світіння синцитіотрофобласта було нерівномірним як за периметром кожної хоріальної ворсини, так і за глибиною трофобластичного покриву, що пояснюється коливанням концентрації різних речовин і є нормою для даної структури [Benirschke K., Kaufmann P. Baergen R.N. Pathology of the human placenta. - 5th ed. - 2006. - New York: Springer. - 1070p.]. Водночас, для всіх хоріальних ворсин відзначена закономірність, яка полягала у тому, що світіння синцитіотрофобласта завжди було сильнішим у базальних ніж апікальних відділах (за винятком самої поверхні трофобласта).

Світіння ендотелію кровоносних судин хоріальних ворсин у порівнянні з синцитіотрофобластом відрізнялося більшою стабільністю по перерізу судини. Особливо чітко будову ендотелію було видно у судинах, які не містили еритроцитів. Розрив між ендотеліоцитами не виявлено. Це пояснюється тим, що вивчалися плаценти з фізіологічним перебігом вагітності. Розриви між ендотеліоцитами, які з'являються при патологічному перебігу вагітності, вдасться виявити даною люмінесцентною методикою, тобто методика може бути застосована як діагностична процедура при ушкодженні ендотеліального покриву кровоносних судин.

Ідентифікацію мікроскопічних структур плаценти здійснювали з урахуванням сучасних уявлень про будову хоріальних ворсин та позаворсинкових структур цього органа у термін вагітності 40 тижнів [Benirschke K., Kaufmann P. Baergen R.N. Pathology of the human placenta. - 5th ed. - 2006. - New York: Springer. - 1070p.]. Для порівняння використовували гістологічний зріз плаценти із забарвленням гематоксиліном і еозином, що найчастіше використовується в гістологічній практиці.

Технічний результат: використання способу, що заявляється, дозволяє здійснити морфологічну оцінку функціонального стану структур хоріального дерева плаценти та діагностувати ушкодження ендотеліального покриву кровоносних судин.