

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009135480/15, 23.09.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.09.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.09.2009

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2011 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 27.07.2011 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: БАТУРИН Г.Н. и др. Микроструктуры железомарганцевых конкреций: Атлас фотографий. - М.: Наука, 1989, с.288.
ЛАМАНОВА Л.М. Сыктывкар: ИГ Коми НЦ Уро РАН «Структура и разнообразие материального мира». Сыктывкар, 2008, с.346-349. ЗЕМЛЯНУХИН В.Н. Лабораторные новости Дальнего Востока, № 1, 1999, с.1-10.

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, пр. Ленина, 36, ТГУ, отдел
трансфера технологий, Л.Н. Борило

(72) Автор(ы):

Ламанова Лидия Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное
учреждение Высшего профессионального
образования "Томский государственный
университет" (RU)(54) СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ УЛЬТРАТОНКОГО СРЕЗА ТКАНЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
МИНЕРАЛЬНЫХ ЗЕРЕН

(57) Реферат:

Изобретение относится к области раздела биоминералогии - медицинской минералогии и может быть использовано:

- в медицине, при исследовании болезней, связанных с воспалениями, нарушением тканевого дыхания, разложением белков;
- в фармакологии, для выявления ятрогенных болезней, вызванных различными лекарственными наполнителями;
- в биофизике (магнитобиологии), для объяснения механизма биомедицинских эффектов, производимых электромагнитными полями в организме человека;

- в минералогии, поскольку значительно расширяют температурно-барометрические, временные и окислительно-восстановительные рамки оксидного и сульфидного минералообразования;

- в биохимии, коллоидной химии и т.д.

Применение ультратонкого среза тканей, изготовленного для электронно-микроскопических исследований, осуществляют для изучения минеральных зерен с помощью электронной микродифрактометрии. Достигается повышение надежности фазового анализа. 6 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2009135480/15, 23.09.2009**(24) Effective date for property rights:
23.09.2009

Priority:

(22) Date of filing: **23.09.2009**(43) Application published: **27.03.2011 Bull. 9**(45) Date of publication: **27.07.2011 Bull. 21**

Mail address:

**634050, g.Tomsk, pr. Lenina, 36, TGU, otdel
transfera tekhnologij, L.N. Borilo**

(72) Inventor(s):

Lamanova Lidija Mikhajlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
Vysshego professional'nogo obrazovanija
"Tomskij gosudarstvennyj universitet" (RU)****(54) METHOD OF USING ULTRATHIN TISSUE SECTION FOR MINERAL GRAIN ANALYSIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention can be used: in medicine, in studying the diseases associated with inflammations, cell respiration disturbance, protein decomposition, in pharmacology, for detecting the iatrogenic diseases caused by various fillers, in biophysics (magnetobiology), for interpreting a mechanism of biomedical effect produced by electromagnetic fields in a human body, in

mineralogy whereas considerably expanding temperature barometric, time and oxidation-reduction limits of oxide and sulphide mineral formation, in biochemistry, colloidal chemistry etc. The use of an ultrathin tissue section prepared for electron microscopy enables mineral grain analysis by electronic microdiffractometry.

EFFECT: higher reliability of the phase analysis.

2 ex, 6 dwg

Изобретение относится к области раздела биоминералогии - медицинской минералогии и может быть использовано:

- в медицине, при исследовании болезней, связанных с воспалениями, нарушением тканевого дыхания, разложением белков;
- в фармакологии, для выявления ятрогенных болезней, вызванных различными лекарственными наполнителями;
- в биофизике (магнитобиологии), для объяснения механизма биомедицинских эффектов, производимых электромагнитными полями в организме человека;
- в минералогии, поскольку значительно расширяют температурно-барометрические, временные и окислительно-восстановительные рамки оксидного и сульфидного минералообразования;
- в биохимии, коллоидной химии и т.д.

Аналогом использования ультратонких срезов биологических тканей для минералогических исследований являются работы ученых из Венгрии: (E.Berki, A.Korányi, E.Major, T.Peres. Ultrastructural Study of Inorganic Substances in Atherosclerotic Aorta Tissue. Calc. Tiss. Res. 4, 84 - 90 (1969), E.Berki, A.Korányi, Gy.Liszka, E.Major. Inorganic content of normal and Atherosclerotic aortas. Orv. Hetil. 106, 201 - 203 (1965)).

В этих статьях ультратонкий (около 60 nm) срез ткани применяется для электронно-микроскопического изучения неорганических зерен из биологической ткани атеросклеротической аорты. Кроме того, в работах E.Berki, A.Koranyi et. al. приводятся данные электронного микродифрактометрического анализа диспергированной и переведенной в суспензию неорганической составляющей атеросклеротических бляшек. При этом используется хорошо известный и достаточно широко применяемый в настоящее время метод дифрактометрии неорганических зерен в коллодиевом препарате. Данный метод описан и часто применяется в работах Г.Н.Батурина (Батурин Г.Н., Дубинчук В.Т. Микроструктуры железомарганцевых конкреций: Атлас микрофотографий. М.: Наука, 1989, 288 с.) Способ исследования биологических тканей в коллодиевом препарате имеет следующие недостатки:

1. Возникает необходимость многоступенчатого и сложного изготовления дополнительного препарата на коллодиевой подложке для электронной микродифракции, требующего дополнительных реактивов, материалов, приспособлений, времени и усилий высококвалифицированных кадров.
2. При исследовании препарата на коллодиевой основе отсутствует визуальная связь между размером, морфологией изучаемого зерна, его расположением в ткани, с одной стороны, и кристаллическим строением и фазовым составом, с другой стороны. Невозможно непосредственное наблюдение взаимного воздействия друг на друга живой ткани и биоминерала.
3. Возникает опасность смешивания различных минеральных фаз на стадии диспергирования и суспендирования, при приготовлении препарата на коллодиевой подложке, что приводит к дополнительным трудностям в расшифровке микродифрактограмм.
4. Раздробленность минеральных зерен приводит к осложнению оценки процентного соотношения аморфных, монокристаллических и поликристаллических зерен.

Широко известен метод суспензионных препаратов на фармваровой пленке, также описанный Г.Н. Батуриным. Однако этот метод дублирует все недостатки коллодиевого препарата и, кроме того, не позволяет достоверно проводить фазовую диагностику слоистых минералов с хорошо развитой гранью (110), т.к. в ходе

приготовления препарата путем свободного осаждения из раствора или аэрозоля они прилегают к подложке именно этой гранью. В таких случаях на микродифракционных картинах отсутствуют необходимые для идентификации минералов отражения 001.

Размер минеральных зерен в тканях человеческого организма очень редко достигают 100-200 мкм. Обычно эти минеральные выделения не превышают 50 мкм, а нижняя граница размерности находится в наноуровневом диапазоне и измеряется в первых нанометрах. Использование таких зерен из ткани организма для рентгенофазового анализа является невыполнимой задачей по ряду причин. Это трудности, связанные с экстракцией минерального вещества с супертонкой размерностью зерен, с присутствием в общей массе аморфных частиц и др. Поэтому имеется острая необходимость разработки метода исследования фазового состава биоминеральных зерен в тканях организма. В свете вышесказанного предлагаемый ниже метод представляется вполне отвечающим основным требованиям науки.

Задачей изобретения является разработка способа применения ультратонкого среза тканей для изучения минеральных зерен для структурно-кристаллохимического и надежного фазового анализов биоминеральных зерен в тканях человеческого организма, необходимого для изучения патогенной минерализации человеческого организма при различных заболеваниях, связанных с дистрофическими изменениями тканей, воспалительными процессами в них, иммунодефицитными состояниями и наследственными генетическими изменениями.

Поставленная задача решается тем, что применяют ультратонкий срез тканей, изготовленный для электронно-микроскопических исследований, для изучения минеральных зерен с помощью электронной микродифрактометрии. Объектами применения изобретения являются готовые для электронно-микроскопического исследования ультратонкие срезы не кальцинированных тканей кардиоваскулярной системы: клапанов и участков восходящих аорт кардиобольных, тканей миокарда, эндокарда, перикарда. Исследуемый материал может быть как биопсийным, так и аутопсийным. При всей распространенности и успешном применении электронно-микроскопических исследований биологических тканей, до сих пор никто из медиков не придавал значения и не изучал весьма часто присутствующие в ультратонких срезах кристаллические образования. Эти кристаллические включения принято считать артефактами, вызванными кристаллизацией различных химреактивов осмия, вольфрама, свинца, урана, которыми пропитываются ультратонкие срезы, изготавливаемые для электронной микроскопии. При этом игнорируются очевидные парадоксы, когда в одной партии одинаково и одновременно готовящихся препаратов часть образцов бывает совершенно «чистой» без так называемых артефактов, а другая часть препаратов буквально переполнена включениями кристаллических зерен. Периодически встречаются мягкие ткани, из которых изготовить ультратонкий срез не представляется возможным, так как они при разрезании на ультрамикротоме все время разрываются по непонятной причине. Несмотря на то, что во всех крупных медицинских исследовательских учреждениях имеются электронные микроскопы, никаких дифрактометрических исследований с их помощью до сих пор не проводилось и не проводится. И это несмотря на интенсивное развитие в последние 15 лет медицинской минералогии, которая делает открытие за открытием в организме человека. Для этих исследований не требуется никакой новой техники, химреактивов, помещений и даже специально подготовленных кадров. Для исследований могут использоваться как новые, так и отработанные ультратонкие срезы тканей, которых немало скапливается в любом медицинском НИИ. При работе

со старыми препаратами необходимо учитывать возможность дегидратации содержащих воду или ОН- радикал минералов, неизбежной при хранении ненапыленных образцов на воздухе.

Ультратонкие срезы тканей изготавливаются по стандартным методикам, применяемым в гистологии при электронно-микроскопическом исследовании образцов (Electron Microscopy. Methods and Protocols. Ed. John Kuo. 2007. Humana Press Inc., New Jersey 608 p.).

Толщина срезов для электронной микроскопии всегда меньше 0,2 мкм. Именно такие требования предъявляются к толщине препаратов для электронной микродифракции, поскольку слой минерального вещества свыше 0,2 мкм является непроницаемым для электронов.

Сущность метода заключается в совпадении требований по толщине препарата, предъявляемых к ультратонкому срезу ткани для электронной микроскопии и к электронной дифрактометрии.

Пример 1.

Ультратонкий срез миокарда из зоны инфаркта, изготовленный для электронной микроскопии, был любезно предоставлен ГУ НИИ кардиологии Томского научного центра СО РАМН и использован для микродифракционного исследования на трансмиссионном просвечивающем электронном микроскопе CM-12 Phillips. Образец не подвергался напылению, т.к. таковым было условие передачи образцов кардиоцентром. В ходе обзорного изучения препарата с увеличением от 35000х до 100000х выявлено значительное количество (около 15) наноразмерных зерен. Форма сечений биоминералов была различная: изометричная, округлая, приближенно-гексагональная, призматическая. Различным было и кристаллографическое строение зерен. Большая часть их имела кристаллическое строение, визуально диагностированное по полосам экстинкции. Процентом 20 зерен аморфизовывались под нагревающим действием электронного пучка вследствие потери воды или гидроксил-радикала, входящих в решетку минерала. Об аморфизации зерен свидетельствовало исчезновение полос экстинкции в течение первых секунд. Одно или два зерна в препарате изначально имели аморфное строение. Большинство зерен использовалось для получения микродифрактограмм. На основании анализа микродифрактограмм выяснилось, что большинство зерен имеет монокристаллическое строение, и только одно зерно из десяти является поликристаллическим агрегатом, дающим дифрактограмму кольцевого типа (данные приведены на фиг.1 и 2). Одно из таких поликристаллических зерен было выбрано для фазового анализа. С помощью программы Adobe Photoshop CS Version 8.0 по кольцам электронной микродифрактограммы были рассчитаны межплоскостные расстояния. Расчет межплоскостных расстояний позволил определить минерал как маггемит-С, используя базу данных PCPDFWIN. Данный сильно магнитный минерал кубической сингонии образуется в природе при окислении магнетита или при обезвоживании липидокрокита. Биоминералогией магнетит досконально изучен в бактериях, а с 1992 г. и в клеточных структурах головного мозга, названных магнетосомами. Маггемит же с помощью магнитометрических методов неоднократно определялся в ферритине и в тканях человеческого организма при различных нервных и возрастных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и т.д., поэтому изучение распространенности данного биоминерала в тканях больных представляет огромный научный интерес.

Пример 2.

Методом электронной микродифракции исследовался другой ультратонкий срез миокарда из зоны инфаркта, подготовленный для электронной микроскопии и отобранный из другой партии образцов, поступивших в более раннее время, чем первый препарат. Объект исследования также не подвергался напылению.

В ходе обзорного изучения препарата с увеличением от 45000х до 100000х выявлено 18 наноразмерных зерен. Как и в первом примере, форма сечений биоминералов была различная: изометричная, округлая, приближенно-гексагональная, призматическая. Различным было и кристаллографическое строение зерен. Большая часть их имела монокристаллическое строение. Два зерна в препарате изначально имели аморфное строение. Было снято 8 микродифрактограмм. В ходе расшифровки выяснилось, что 6 зерен имеют межплоскостные расстояния маггемита, а два зерна характеризуются совершенно другими, отличными друг от друга и от маггемита межплоскостными расстояниями. К сожалению микродифрактограмма точечного типа не позволяет однозначно интерпретировать результаты микродифракции, тем не менее, анализируя полученные данные, удалось выделить группу минералов, чьи межплоскостные расстояния подходят по своим значениям к измеренным. На фиг.3 и 4 изображен монокристалл в гистологическом препарате, межплоскостные расстояния которого очень близки группе соединений, представляющих собой гидроксиды металлов: β -Zn(OH)₂ и α -Co(OH)₂, кристаллизующиеся в гексагональной сингонии. Оба соединения не описаны в качестве минералов.

На фиг.5 и 6 представлен призматический кристалл или двойник из того же гистологического препарата, который по вычисленным межплоскостным расстояниям можно отнести к группе рутила.

Преимущества способа применения ультратонких срезов тканей, изготовленных для электронно-микроскопических исследований, для изучения минеральных зерен.

1. Способ является доступным и экономичным для всех научных учреждений, проводящих исследования в сфере электронной микроскопии. Не требуется никаких дополнительных затрат для изучения роли неорганических зерен и минералов в биологических тканях.

2. Способ обладает исключительно редкой и ценной для науки способностью - сочетать визуализацию типов взаимоотношений органического и неорганического вещества, в пределах живого организма, с количественным и качественным (например: фазовым) анализом обеих форм существования материи.

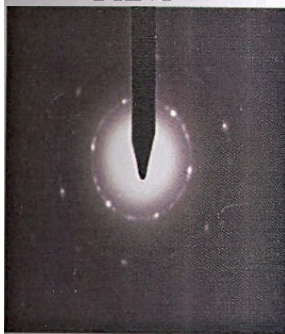
3. Данный способ позволяет осуществить уникальную возможность кристаллохимической и фазовой идентификации наноразмерных зерен в живой ткани.

Формула изобретения

Применение ультратонкого среза тканей, изготовленного для электронно-микроскопических исследований, для изучения минеральных зерен с помощью электронной микродифрактометрии.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6