

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 165931 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3232/87

(51) Int.Cl.5

G 01 N 23/225

(22) Indleveringsdag: 25 jun 1987

G 01 N 33/483

(41) Alm. tilgængelig: 12 feb 1988

(44) Fremlagt: 08 feb 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 26 jun 1986 US 878936

(71) Ansøger: *Spectro-Scan, Inc; 841 West San Bruno Avenue; Suite 10; San Bruno, California 94066, US

(72) Opfinder: Burton B. *Silver; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til bestemmelse af den intracellulære koncentration af et mineral samt fremgangsmåde til at diagnosticere sygelige tilstande, tilbøjelighed for sygdom eller metabolisk status

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3232-87

Ved en fremgangsmåde til bestemmelse af intracellulære mineralkoncentrationer udsættes en vævsprøve, såsom udstrøgne celler fra tunge afskrab, for exciterende stråler, typisk en scannende elektronstråle, og den opnåede profil for den emitterede røntgenstrålefluorescens anvendes som basis for mineralanalyserne. Et antal korrelationer er udført mellem forskellige sygdomstilstande, tilbøjeligheder for sygdomstilstande, metabolisk status, baseret på forhøjet og nedsat koncentration af nogle eller alle mineralerne.

DK 165931 B

Den foreliggende opfindelsen angår en fremgangsmåde til bestemmelse af den intracellulære koncentration af et mineral i en vævsprøve, især de lavmolekylære mineraler i relativt små vævsprøver, især med det formål at diagnosticere sygelige tilstande, tilbøjelighed for sygdom eller metabolisk status.

Flere lavmolekylære mineraler, såsom calcium, phosphor, kalium, magnesium, natrium og chlor, er af væsentlig betydning for en passende vækst, udvikling og funktion af væv. Hidtil har forskere forsøgt at relatere serumkoncentrationer af disse mineraler til sygdomme og metabolisk status for patienter. Koncentrationer af mineralerne i serum afviger imidlertid betydeligt fra de intracellulære koncentrationer af mineralerne. Den foreliggende opfindelse er baseret på den erkendelse, at de intracellulære mineral-koncentrationer i højere grad afslører sygelige tilstande og andre stress-faktorer, end tilfældet er med serum-koncentrationerne for de samme mineraler.

Bestemmelsen af intracellulære mineralkoncentrationer er imidlertid problematisk. Ved hidtil kendte metoder, såsom atomabsorption, kræves forholdsvis store vævsprøver for at opnå den ønskede information. Selv om sådanne prøver kan fås ved kirurgiske indgreb, vil en sådan prøveudtagning være uønsket til rutine-screening af asymptomatiske patienter. Nogle forskere har forsøgt at omgå dette problem ved at anvende lymfocytter som cellekilde. Lymfocytter er dog uheldigvis ikke generelt anvendelige, fordi deres intracellulære mineralkoncentrationer ikke nødvendigvis svarer til koncentrationerne i legemesvævet, og de har et højt forhold mellem kerne og cytoplasma. Endvidere vil status for lymfocytter i høj grad være påvirket af forekommende infektion og status for det tilsvarende immun-respons. Yderligere

synes metoden til isolation af lymfocytter at have en virkning på de målte koncentrationer af intracellulære mineraler.

- 5 Af disse grunde vil det være ønskeligt at tilvejebringe forbedrede metoder for måling af koncentrationer af intracellulære mineraler ud fra forholdsvis små vævsprøver, der er opnået uden egentlige indgreb. Det ville yderligere være ønskeligt at tilvejebringe en metode, som giver meget nøjagtige målinger af den intracellulære
- 10 koncentration af alle mineraler af betydning, muliggør måling af en absolut koncentrationsværdi i stedet for forholdet mellem mineraler og giver information, som kan korreleres med sygdom og metabolisk status hos den patient, som undersøges.
- 15 Intracellulære mineralkoncentrationer påvirkes af et antal sygdomme. Magnesium og andre mineraler har relation til kardiovaskulære sygdomme, ischæmi, hjerteneurose, følsomhed over for cardiotoxiske midler, samt har en effekt på den coronære blodstrøm, blodkoagulation
- 20 og arteriogenese. Seelig og Heggveit (1974) Amer. J. Clin. Nutrition 27:59-79. Kardiovaskulære sygdomme og forholdet mellem mineraler i serum, blod, og væv er rapporteret af mange forskere. Se f.eks. Abraham (1977) N. Eng. J. Med. 296:862-863; Dyckner (1979) A. Heart
- 25 J. 97:12-18; Whang (1981) Acta. Med. Scand. 647:139-144; Levine (1984) N. Engl. J. Med. 310:1253-1254; og Levin (1985) Cardiovascular Med. October:37-42. Hook et al. (1985) J. Am. Coll. Nutrition 4:332, Abstract 52, 26th Annual Meeting of the American College of Nu-
- 30 trition and the Fourth International Symposium on Magnesium, beskriver anvendelsen af elektron-prøve-mikroanalyse til bestemmelse af magnesium i perifere blod-mononucleære celler.

Bestemmelsen af det intracellulære forhold mellem magnesium og calcium og sammenhængen mellem størrelsen af dette og diagnosticerede cardiovasculære sygdomme blev først rapporteret af ansøgeren i Federation Proceedings, Vol. 42, March 1983, og ved International Symposium on Magnesium and its Relationship to Cardiovascular, Renal, and Metabolic Disorders, Los Angeles, California, februar 1985. Ved præsentationen blev også diskuteret ændringer af calcium- og magnesium-koncentrationer hos sportsfolk før og efter en atletisk konkurrence. En afhandling baseret på den tidligere præsentation blev efterfølgende publiceret i Magnesium: Experimental and Clinical Research, 4:210-211, November 1985.

Den foreliggende opfindelse angår en ikke-invasiv metode til kvantitativt at bestemme intracellulære mineral-koncentrationer i vævsprøver, hvorved det er muligt at korrelere sådanne mineralkoncentrationer med bestemte sygdomme og metabolisk status, især cardiovasculære sygdomme, hypertention og metaboliske knogleforstyrrelser, såsom osteoporose. Intracellulære mineralkoncentrationer måles ved at udsætte vævsprøven for eksiterende stråler af en forud valgt energi, idet man måler intensiteten af den fra vævsprøven udsendte fluoroscens, i det mindste inden for et energibånd, som er karakteristisk for det pågældende mineral, hvorved den intracellulære koncentration af mineralet bestemmes ved sammenligning af den målte intensitet af fluoroscensen med størrelsen af baggrunds-fluoroscensen ved et andet energibånd. Metoden kan anvendes på så små vævsprøver som 1 til 3 celler. Intensiteten af fluoroscensen inden for hvert energibånd er proportional med den intracellulære koncentration af et bestemt mineral, og testning af talrige personer har muliggjort korrelation af sådanne intracellulære mineralkoncentrationer med visse sygdomme og metaboliske tilstande.

Ved en foretrukken udførelsesform udtages en celleprøve fra vævet under tungen ved afskrabning og fiksering på et passende substrat. Cellerne udsættes derefter for eksiterende bestråling med en energi i et område
5 mellem 8 og 12 keV, og den resulterende fluorescens måles i flere forudbestemte energibånd, svarende til de ønskede mineraler, typisk magnesium, calcium, kalium, natrium, chlor og phosphor. En normaliseret værdi for mineralkoncentrationen opnås ved sammenligning af den
10 målte fluorescens med en baggrundsfluorescens, typisk opnået ved måling af udsendt bestråling ved et bånd fri for forventet fluorescens-toppe. Den normaliserede værdi er forholdet mellem fluorescensen inden for mineralbåndet og fluorescensen i det bånd, som ventes at
15 være fri for toppene.

Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes en fremgangsmåde til at bestemme de intracellulære mineralkoncentrationer, der kan benyttes til at diagnosticere
cardiovasculære tilstande og metabolisk status. Metoden
20 muliggør kvantitativ måling af biologisk vigtige mineraler, såsom magnesium, calcium, phosphor, kalium, natrium og chlor, og giver endvidere en diagnostisk rettesnor for at relatere sådanne koncentrationer til forekomsten af eller modtageligheden for cardiovasculære sygdomme,
25 hypertention, osteoporose og periodontal knoglestyrke. Metoden er velegnet i forbindelse med meget små vævsprøver, såsom tungeafskrab, men kan benyttes i forbindelse med praktisk taget enhver kilde for levende, fortrinsvis nucleerede, aerobe celler eller væv. Mineralerne
30 detekteres ved at udsætte celleprøven for eksiterende bestråling i form af en elektronstråle med høj energi, og iagttage intensiteten af fluorescensen ved bestemte energibånd, som er karakteristiske for det mineral, som skal detekteres. Ved at udføre testningen på patienter
35 med cardiovasculære lidelser og osteoporose, og ved

at sammenligne resultaterne af prøverne med en population af asymptomatiske individer, har det været muligt at udvikle intracellulære mineral-profiler, som er karakteristiske for cardiovasculære sygdomme, osteoporose og periodontal knogletab.

Den foreliggende opfindelsen er baseret på undersøgelse af individuelle vævsceller, som er udtaget af en patient. Forskellige cellulære kilder er egnet, idet hovedbetingelsen er, at cellerne er levende, fortrinsvis nucleerede, og udviser ultrastruktur eller mikrovilli. Sådanne celler fås normalt ved biopsi, vaginal afskrab, spyt, afskrab fra underside af tungen og lignende. Fortrinsvis benyttes tungeafskrab, der let fås og giver celler som er meget karakteristiske for patientens totale cellulære metabolisme. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er også velegnet til at bestemme intracellulære mineralkoncentrationer i serumprøver, herunder lymfocytter og erythrocytter. Mineralkoncentrationerne i sådanne prøver anses dog ikke for at være repræsentative for patientens totale sygdoms- eller metaboliske status.

Tungeafskrab fås hensigtsmæssigt ved kraftigt at skrape slimhinden ved tungeroden tæt ved frenulum for derved at få isoleret nucleerede epithelceller. Forud for skrabningen bør mundhulen være skyllet flere gange med destilleret vand, og patienten bør ikke have spist en time forud for prøven. Den til skrabningen anvendte spatel må være fri for sporelementer og andre materialer, som kan indvirke på elektronfluorescensen, der benyttes til detektering af mineralerne som skal testes, således som det skal beskrives i enkeltheder i det efterfølgende. Spatlen må gnubbes kraftigt til opnåelse af den nødvendige celleprøve, men uden at forårsage smerte eller blødning.

Cellerne på spatlen overføres til et observationssubstrat, som beskrevet i det efterfølgende, og en udstrygende bevægelse anvendes til at fordele cellerne over et forudbestemt areal. Medens udstrygningen stadig er
5 frisk, dryppes et mildt fixativ på cellerne, og der henstilles til tørring. Egnede fixativer må være fri for stoffer, som kan fluorescere under elektronbombardement og interferere med testningen. Et egnet fixativ består af 95 % ethylalkohol og 2,5 % carbovoks fra fir-
10 mæet Medical Packaging Corporation, Panorama City, California, forhandles under varemærket Cytology Fixative. Et andet egnet fixativ er 84,2 % isopropylalkohol, 6,4 % polyethylenglycol, idet resten af drivmiddel. Dette fixativ sælges under varemærket Spray-Cyte af Clay Adams,
15 Division of Becton-Dickenson, Parsippany, New Jersey. Så snart præparatet er lufttørret, kan det opbevares, transporteres til et centrallaboratorium for testning eller kan testes umiddelbart.

Observationssubstrater må være ledende og fri for materialer, som kan interferere med det forventede fluorescensmønster fra de cellulære mineraler. Særlig vel-
20 egnet er carbon-præparater eller planchetter med høj renhed, typisk med en dimension på 25 x 50 mm. Præparaterne kan fremstilles ud fra GTA Grade Grafoil^R fra
25 Union Carbide Corp., Danbury, Connecticut. Sædvanligvis dannes et observationsområde på kulstofskiven ved dannelse af en fordybning for at angive en passende placering af vævsprøven. Iagttagelsessubstratet kan også fremstilles ud fra andre materialer, såsom glas eller plast,
30 men det vil være nødvendigt at anbringe et ledende lag på overfladen for at muliggøre drift af scanningselektronmikroskopet som beskrevet i det efterfølgende.

Detektionen af de intracellulære mineralkoncentrationer afhænger af et bombardment af celleprøven med stråler

af høj energi, typisk elektroner eller røntgenstråler. Energien af denne bestråling overføres delvis til atomerne i prøven, herunder de mineraler, der skal bestemmes, og den overførte energi vil delvis resultere i en fluorescens af sekundære stråler, typisk røntgenstråler. Fluorescenslinier eller bånd for røntgenenergien fra det pågældende atom eller grundstof er entydigt karakteristisk for det pågældende atom eller grundstof. Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan man således foretage måling af fluorescensen inden for disse karakteristiske røntgenstrålebånd til at bestemme koncentrationen af mineralerne, som findes i cellerne.

Energikilden må besidde en energi mellem 8 og 15 keV, fortrinsvis 8-12 keV til at eksitere de biologiske mineraler, som skal måles, og må også kunne fokuseres, fordi det er ønsket at eksitere enkelte celler uden at eksitere de omgivende celler.

Det er endvidere hensigtsmæssigt, at cellerne kan visualiseres under prøvningen. En sådan visualisering gør det muligt at scanne de enkelte celler, således at levedygtige, ikke-beskadigede celler kan udvælges til excitation. Til dette formål har det vist sig særligt bekvemt at anvende kommercielt tilgængelige scannings-elektronmikroskoper til udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Sådanne mikroskoper frembringer elektronstråler med energier i området 8 til 12 keV, som kan fokuseres og muliggør en visualisering af celleprøven ved forskellige forstørrelser.

Til detektion af fluorescensen, som udsendes fra vævscellerne, når de bombarderes med den exciterende elektronstråling, benyttes en detektor, der skal muliggøre

diskrimination inden for det energibånd, som anvendes, typisk fra 500 til 5000 eV. Egnede detektorer er silicium-lithiumdetektorrør, der forhandles på markedet af mange leverandører, såsom Princeton Gamma Tech, Princeton, New Jersey.

De observerede emissionsbånd falder generelt inden for området 500 til 5000 eV, idet de udvalgte særlige bånd er fri for interferens fra andre kilder. Emissionsbånd svarende til de seks mineraler, som har betydning, sammen med to baggrundsemissionsbånd, der udvælges for at være fri for emission under prøvebetingelserne, fremgår af efterfølgende tabel 1. Den omhandlede metode omfatter integrering af emissionstællinger fra vævsprøven i hvert af de ønskede emissionsbånd i et forudbestemt tidsrum. Sådanne emissioner vil, når de sammenlignes med baggrundsemissionerne som beskrevet i det efterfølgende, kunne relateres direkte til den absolute mineralkoncentration i en enkelt celle. Sædvanligvis vil et antal af individuelle celler blive testet, og cellekoncentrationen beregnes som et gennemsnit.

Tabel 1

<u>Element</u>	<u>Bånd-grænse (eV)</u>	
	<u>Bred</u>	<u>Snæver</u>
Baggrund	680 - 810	687,5 - 802,5
Magnesium	1170 - 1330	1179,8 - 1324,2
Phosphor	1900 - 2090	1935,1 - 2088,9
Natrium	2220 - 2390	2227,3 - 2384,7
Chlor	2530 - 2710	2539,5 - 2700,5
Kalium	3220 - 3400	3227,6 - 3396,4
Calcium	3600 - 3780	3603,5 - 3776,5
Baggrund	4100 - 4250	4100 - 4250

Efter at den ønskede vævsprøve er monteret og fikseret på en carbonstrimmel, anbringes denne i prøveholderen af scanningselektronmikroskopet, og prøvekompartimentet evakueres. Det har vist sig, at den relative vinkel for prøven til elektronstrålen har en effekt på visualisering og eksitering af de individuelle celler. Det foretrækkes, at indfaldsvinklen mellem elektronstråling og carbonstrømmen reduceres til under ca. 60° , fortrinsvis under ca. 50° , og mere fortrinsvis under 30° . Den mindste indfaldsvinkel synes at forbedre emissionen for de sekundære elektroner, der producerer både det visuelle billede og inducerer røntgenstrålefluorescensen. Endvidere synes vinklen at maximere indtrængningen af elektroner gennem hele cellen, hvilket sikrer, at den totale mineralconcentration iagttages. Under anvendelse af et konventionelt elektronmikroskop med en lodret elektronstråle kan indfaldsvinklen reduceres ved at hælde prøveholderen opad fra det horisontale plan.

Såsnart præparatholderen for den cellulære prøve er bragt på plads og vakuumet er opnået, tilsluttes mikroskopet med en forstørrelse på fra 250 til 300 gange, hvilket sædvanligvis vil afsløre flere hundrede enkeltceller. Operatøren bør udvælge celler, som er nucleerede, ikke-beskadigede og udviser mikrovilli eller har en diskret membranultrastruktur. Efter udvælgelse af en sådan celle forøges forstørrelsen, indtil kun den celle er synlig på mikroskopets skærm. Som følge af mikroskopets egenskaber er scanningsarealet af elektronstrålen reduceret til den nævnte enkelte celle, og indfaldende bestråling rammer ikke andre celler i præparatet.

Såsnart der er fokuseret på den enkelte celle tilsluttes røntgenfluorescensdetektoren, og det udsendte strå-

- lingsmønster iagttages i et forudvalgt tidsrum ved den benyttede forstørrelse, typisk ca. 10 sek. Detektoren er forbundet med en tæller, hensigtsmæssigt en computer kontrolleret tæller, som registrerer strålingstællinger ved hvert energibånd af interesse. Efter forløbet af prøveperioden er der således foretaget en måling af den totale emission for hvert bånd. Denne proces gentages for et ønsket antal celler, typisk 10 til 100 og fortrinsvis 15 til 25. Så snart alle data er akkumuleret beregnes middelværdien for energiemission pr. celle. Efter opnåelse af middelværdien for energiemissionen for hvert energibånd af betydning, herunder baggrundsenergibåndene, er det nødvendigt at beregne mineralkoncentrationen i hver celle.
- Den beskrevne procedure gør det muligt direkte at beregne koncentrationerne i konventionelle enheder, såsom Mækv/l. Ved anvendelse af kalibrerede individuelle standards til sammenligning er det muligt direkte at beregne koncentrationerne, idet man udnytter samme målebetingelser, f.eks. masse pr. celle eller volumen, efter følgende ligning:

$$C = \frac{SP}{STD} (Mækv(STD))$$

hvor: C = ukendt mineral-koncentration.
 SP = Prøve-tælling.*
 STD = Standard-tælling.*
 Mækv(STD) = Standard mineral-koncentration.

* Efter normalisering af standard og ukendt ved subtraktion af baggrund.

- I stedet kan der ved den omhandlede opfindelsen anvendes arbitrære koncentrationsenheder, der er defineret som

fluorescens-tællinger pr. rumfangs-enhed, hvor rumfangs-enheden kan være rumfanget af en enkelt celle, dvs. ca. $800 \mu\text{m}^3$.

5 Spændingskontrollen for elektrongeneratoren i elektronmikroskopet kontrolleres mellem 5 og 15 keV, fortrinsvis mellem 8 og 12 keV, hvilket svarer til eksitationsområdet for de biologiske mineraler, som har interesse. Højere spændinger ville lettere kunne stimulere røntgenstråler fra tungere grundstoffer og ville ikke tilstrækkelig effektivt stimulere de lettere grundstoffer, såsom natrium og magnesium. Spændinger under 5 keV ville ikke være i stand til tilfredsstillende at eksitere de tungere biologiske mineraler. Hensigtsmæssigt vælges en eksitations-spænding på 12 keV. Det bemærkes, at en ændring af eksitations-spændingen vil
10 kræve en recalibrering af systemet.
15

Ved udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen bør den emitterede energidetektor anbringes så nær som mulig ved cellepræparatet for at opfange så stor en del af
20 de udsendte røntgenstråler som muligt. Detektoren anbringes fortrinsvis inden for 50 mm fra prøven, særlig hensigtsmæssigt mellem 20 mm og 10 mm eller mindre fra prøven. Detektorens vinkel i forhold til præparatets plan er ikke kritisk, men en vinkel på ca. 60° har vist sig hensigtsmæssig, men 90° foretrækkes. Det bemærkes, at så snart en af disse parametre ændres vil systemet kræve recalibrering. Af særlig betydning er det, at data for kardiovaskulær og metabolisk status, som anføres i det efterfølgende, kun henhører til et særligt
25 system med en særlig konfiguration. Så snart systemet er forandret på væsentlig måde, må dataer korrigeres under hensyn til sådanne forandringer.
30

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er

benyttet til en stor gruppe patienter med cardiovascu-
lære sygdomme og osteoporose, som er screenet til be-
stemmelse af intracellulære koncentrationer af magnesium,
calcium, kalium, natrium, chlor og phosphor. Ved at
5 sammenligne de observerede koncentrationer hos de syge
patienter med samme antal tilsyneladende sunde og symptom-
fri kontrol personer er der opstillet et område for
optimal og suboptimal mineralkoncentrationer. Disse
områder er anført i efterfølgende tabel 2.

Tabel 2

<u>Mineral</u>	<u>Optimalt område*</u>	<u>Sub-optimalt område*</u>
Magnesium	800 - 1000	600 - 800
Calcium	50 - 80	80 - 200
Kalium	100 - 400	50 - 100
Natrium	10 - 14	14 - 30
Chlor	11 - 25	25 - 50
Phosphor	900 - 1200	1200 - 2100

10 * Enheder for fluorescens-intensitet (top/baggrund)
/celle volumen ($800 \mu^3$).

De i tabel 2 angivne enheder er naturligvis specifikke
for det apparatur, der anvendes til screening af patien-
terne og kontrolindividerne. Mønstret til identificering
15 af nedsat koncentrationer af magnesium og kalium samt
forhøjede af calcium, natrium, chlor og phosphor til
korrelering af disse to bestemte sygdomme er imidler-
tid universel og kan anvendes i forbindelse med et vil-
kårligt system. Særlige sygdomsforhold, som hidtil er
20 afsløret, fremgår af tabel 3.

Tabel 3

<u>Sygdom</u>	<u>Mg</u>	<u>Ca</u>	<u>K</u>	<u>Na</u>	<u>Cl</u>	<u>P</u>
Cardiovas- culær til- stand	D	E	D	E	N	E
Hyperten- sion	D	E	D	E	N	E
Osteporose/ Periodontal knoglebrud	D	E	E	N	E	E

D - Nedsat

E - forhøjet

N - normal

- Den foreliggende opfindelsen er særlig velegnet som en screeningsmetode til at identificere patienter med tilbøjelighed til cardiovasculære lidelser og/eller osteoporose. Ved anvendelsen af fremgangsmåden ifølge
- 5 opfindelsen kan der opnås cellulære mineral-profiler for patienten, og de kan sammenlignes med indikationerne i tabel 3 eller med fremtidige korrelationer, som opnås ved anvendelse af mineral-analyseteknikken. Hvis patienten udviser risikofaktorer i forbindelse
- 10 med enhver af de nævnte mineralkoncentrationer, især koncentrationerne for magnesium, calcium, kalium og phosphor, kan der foretages yderligere diagnostiske prøver for at finde ud af, om patienten rent faktisk har risiko for cardiovasculære sygdomme, hypertension,
- 15 osteoporose og/eller periodontal knoglesvind.

Opfindelsen illustreres ved hjælp af efterfølgende eksempel.

EksempelMaterialer og metoder

1. Tungeafskrab blev udtaget fra humane individer efter omhyggeligt skylning af mundområdet med destilleret vand. En kemisk ren træspatel blev anvendt til kraftig skrabning af celler og udstrygning af dem på et substat bestående af en ren carbonskive. I stadig fugtig tilstand blev det udstrøgne præparat fikseret ved hjælp af et flydende cytologisk fixativ fra en engangsemballage eller et cytologisk spray-fixativ som ovenfor beskrevet. Præparatskiverne blev lufttørret og derefter undersøgt i et scanning electron-mikroskop (International Scientific Instruments, Santa Clara, California, Model/IIIA) for størrelse, fordeling og celleegenskaber, dvs. kerne, cellemembran-elementer, flad position og overlapning. Indfaldsvinklen for elektronstråling blev indstillet til 55 °, og de fluorescerende røntgenstråler blev detekteret ved hjælp af en energi-dispersiv røntgenstråle-analysator (Princeton Gamma Tech, System III Model 3000T). Beregninger af røntgenstråleintensiteten for hvert grundstof pr. cellerumfang blev udført på basis af forholdet mellem maximum og baggrundsstråling, iagttaget for hvert grundstof i de foruddefinerede energibånd som ovenfor beskrevet. Sådanne værdier for forholdet mellem maximum og baggrundsstråling blev derefter korreleret med normale og unormale tilstande ved screening af store populationer af symptomatiske og asymptomatiske forsøgspersoner.

Tre sunde og symptomfrie kontrolgruppe blev undersøgt. Den første gruppe bestod af 11 lige gamle triatleter. Den anden gruppe bestod af 10 forskellige personer uden påviselige sygdomssymptomer. Den tredje gruppe omfattede 4 forskellige personer uden påviselige sygdomssymptomer,

og som endvidere ikke udviste symptomer på koronar arteriesygdom (CAD), når de blev undersøgt ved intravenøs angiografi.

Fire grupper patienter med symptomer blev også undersøgt.

- 5 Den første gruppe bestod af elleve patienter, som var underkastet hjertekirurgi, og som var diagnosticeret med cardiovasculær sygdom ved intravenøs angiografi. Den anden gruppe bestod af 34 patienter, der var diagnosticeret for arteriosclerotisk hjertesygdom (ASHD),
10 periferisk vasculær sygdom og hypertension med og uden kaliumopfyldning. Den tredje gruppe bestod af ti patienter, der var diagnosticeret med atrialfibrillation (AF). Den fjerde gruppe bestod af seksten patienter, diagnosticeret med osteoporose og/eller periodontal
15 sygdom.

Resultater

- Tabel 4 angiver de observerede intracellulære mineral-koncentrationer for de forskellige test- og kontrol-grupper, hvor koncentrationenhederne er angivet som
20 fluorescens (top/baggrund)/cellevolumen ($800 \mu\text{m}^3$).

TABEL 4
Mineral-koncentration

<u>Kontrol eller</u> <u>patientgruppe</u>	<u>Ca</u>	<u>Mg</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>Na</u>	<u>Cl</u>
Triatleter						
Asymptomatisk blandet						
Asymptomatisk blandet*	66,8±2,0	806±8,4	1208±23	109,3±5,8	13,3±0,2	16,7±1,1
Opererede Angiogram-						
patienter**	94,3±9,7	695±14,8	1423±39	95,5±9,9	11,5±0,5	16,1±1,1
ASHD og HTN						
patienter ≠	121,4±66,0	727±6,8	1460±51	79,9±3,9	12,9±0,5	20,4±1,7
Atrial-Fibrillation						
patienter ≠	113,4±4,2	711,2±9,3	1168±37	86,7±5,9	12,1±0,2	19,0±0,8
Patienter med						
osteoporose og perio-						
dontal knoglesvind	118,4±10,6	730,9±12,5	1437±67	141,5±20,1	12,1±0,3	17,1±1,6

16

* Bekræftet som fri for kardiovaskulær sygdom ved antioграфи.

** Ved intravenøs kalium for og under testen

≠ Patienter, som fik kalium-supplement, havde en gennemsnitlig kalium-koncentration på 176,9± 18,9
 ≠ En patient havde intracellulært kalium på 620,5.

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af den intracellulære
koncentration af et mineral i en vævsprøve, k e n d e -
t e g n e t ved, at vævsprøven udsættes for eksiterende
stråling i form af en fokuseret elektronstråle med en
5 energi i området 8 til 15 keV, at man måler intensi-
teten af den fra vævsprøven udsendte fluorescens, i
det mindste inden for ét energibånd, som er karakteristisk
for det pågældende mineral, og

10 at den intracellulære koncentration af mineralet bestemmes
ved sammenligning af den målte intensitet af fluorescensen
med størrelsen af baggrunds-fluorescensen ved et andet
energibånd.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at den eksiterende stråling er rettet mod en enkelt
15 celle i vævsprøven.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at den eksiterende stråling er rettet mod et præ-
parat af udstrøget cellevæv under anvendelse af en scan-
nings-elektronstråle med den nævnte energi,

20 at man visualiserer individuelle celler i det udstrøgne
præparat ved hjælp af en sekundær elektrondetektor,

at man identificerer mindst én enkelt levende individuel
celle, baseret på forud bestemte selektionsegenskaber,

25 at man scanner den nævnte levende celler med elektron-
strålen,

at man måler intensiteten af fluorescensen, som udgår fra den ene levende celle med mindst ét energibånd, der er karakteristisk for det pågældende mineral, og

5 at man bestemmer den intracellulære koncentration af mineralet ved at sammenligne den målte intensitet af fluorescensen med et mål for baggrunds-fluorescensen ved et andet energibånd.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at en enkelt individuel celle udvælges, baseret på tilstedeværelse af en kerne, microvilli og membran-ultrastruktur.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at et minerals fluorescenseegenskaber måles ved hjælp af en røntgendetektor, der kan måle strålingen med en energi i området fra 500 til 5000 eV.

6. Fremgangsmåde til at diagnosticere sygelige tilstande, tilbøjelighed for sygdom eller metabolisk status, k e n d e t e g n e t ved,

20 at man ved fremgangsmåden ifølge krav 1-5 bestemmer de intracellulære koncentrationer af flere cellematerialer,

at man sammenligner de intracellulære mineralkoncentrationer med forud bestemte normale koncentrationer til at bestemme et mønster for forhøjede, nedsatte eller normale koncentrationer, og

25 at man diagnosticerer sygdommen, tilbøjeligheden for sygdom eller metabolisk status baseret på den opnåede profil.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t

ved, at de intracellulære koncentrationer af celleminerallerne bestemmes ved:

at vævsprøven udsættes for eksiterende elektronstråling med den i krav 1 angivne energi,

- 5 at man måler intensiteten af fluorescensen fra vævsprøven inden for flere energibånd, der er karakteriske for de intracellulære mineraler, og

- 10 at man bestemmer de intracellulære koncentrationer af celleminerallerne ved at sammenligne intensiteten af fluorescensen med et mål for baggrunds-fluorescensen ved et andet energibånd.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at vævsprøven er udstrøgne vævsceller.

- 15 9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at de udstrøgne vævsceller stammer fra tungeafskrab.