



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/48 (2024.01); G01N 1/30 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023120337, 02.08.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.08.2023

Дата регистрации:
07.06.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.08.2023

(45) Опубликовано: 07.06.2024 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Морозов Виталий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2110802 C1, 10.05.1998. ЕА 16530
В1, 30.05.2012. МОРОЗ Г.А.

Морфофункциональные изменения в
надпочечных железах половозрелых крыс при
систематическом воздействии
гипергравитации. Крымский журнал
экспериментальной и клинической медицины.
2016. Т.6 N.3. С.79-83. УЛЬЯНОВ А.Г. и др.
Кариометрические и электронно-
микроскопические исследования (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КОРКОВЫХ ЭНДОКРИНОЦИТОВ
НАДПОЧЕЧНИКОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к патологической анатомии и может быть использовано для оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников. Для этого осуществляют подготовку образцов коркового вещества надпочечника с эндокриноцитами. Изготавливают срезы. Выбирают не менее 10 клеток в поле зрения случайным выбором на срезе коркового вещества надпочечника на увеличении 8000 и фотографируют с получением электронограмм путем трансмиссионно-электронной микроскопии. Оценивают в баллах морфологические характеристики структурных образований, таких как ядро, кариолемма, перинуклеарное пространство, ядрышка и его структура, хроматин, агранулярная

эндоплазматическая сеть, митохондрии, липидные включения, взаимный контакт мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений на электронограммах. Причём наименьшее цифровое значение - 0 баллов присваивают той морфологической характеристике, которая максимально изменяет морфологию типичной органеллы коркового эндокриноцита, а наибольшее цифровое значение в баллах присваивают той морфологической характеристике, которая по структуре полностью соответствует норме. Оценивают функциональное состояние корковых эндокриноцитов надпочечников путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных

образований данных клеток на электронограммах. Устанавливают митоз - в случае, когда сумма баллов равна 1-8, гипофункцию - в случае, когда сумма баллов равна 9-23 балла, гиперфункцию - в случае, когда сумма баллов равна 24-31 балла, нормальную

функцию - в случае, когда сумма баллов равна 32-36 баллов. Изобретение позволяет быстро и объективно оценить функциональное состояние корковых эндокриноцитов надпочечников. 5 ил., 4 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

темных и светлых клеток коры надпочечника у млекопитающих. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018; 7(3): 61-67. ZAMFIR C. et al. Ultrastructural characteristics of the adrenal gland. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2000 Jul-Sep;104(3):91-3. МОТТА Р. et al. Three dimensional organization of mammalian adrenal cortex. A scanning electron microscopic study. Cell Tissue Res. 1979 Jan 30;196(1):23-3.

RU 2820729 C1

RU 2820729 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 1/30 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/48 (2024.01); G01N 1/30 (2024.01)

(21)(22) Application: **2023120337, 02.08.2023**

(24) Effective date for property rights:
02.08.2023

Registration date:
07.06.2024

Priority:
(22) Date of filing: **02.08.2023**

(45) Date of publication: **07.06.2024** Bull. № 16

Mail address:
**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhajlovna**

(72) Inventor(s):
Morozov Vitalii Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):
**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR ASSESSING FUNCTIONAL STATE OF ADRENAL CORTICAL ENDOCRINE CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pathological anatomy.

SUBSTANCE: invention can be used to assess the functional state of adrenal cortical endocrine cells. For this purpose, samples of adrenal cortex with endocrine cells are prepared. Sections are made. At least 10 cells are selected in the field of view by random selection on a section of adrenal cortex at magnification of 8,000 and photographed with obtaining electron diffraction patterns by transmission-electron microscopy. Morphological characteristics of structural formations, such as nucleus, karyolemma, perinuclear space, nucleolus and its structure, chromatin, agranular endoplasmic reticulum, mitochondria, lipid inclusions, mutual contact of mitochondrial membranes, agranular endoplasmic reticulum and lipid inclusions on electron diffraction patterns. Least numerical value—0 points is assigned to that morphological characteristic, which

maximally changes the morphology of a typical cortical endocrine cell organelle, and the highest numerical value in points is assigned to the morphological characteristic which completely corresponds to the norm in terms of structure. Functional state of adrenal cortical endocrine cells is evaluated by calculating the sum of digital values, assigned to morphological characteristics of structural formations of these cells on electron diffraction patterns. Mitosis is stated—if the total score is 1–8, hypofunction—if the total score is 9–23 points, hyperfunction—when total score is equal to 24–31 points, normal function—when total score is equal to 32–36 points.

EFFECT: invention enables fast and objective assessment of the functional state of adrenal cortical endocrine cells.

1 cl, 5 dwg, 4 tbl, 4 ex

RU 2 820 729 C1

RU 2 820 729 C1

Изобретение относится к области медицины, ветеринарии, морфологии, и предназначено для оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на электронограммах.

Одним из методов исследования структурных образований живых клеток в 5
определенный момент времени является электронная микроскопия, в основе которого лежит использование пучка электронов, сфокусированного электромагнитными линзами для получения изображения. Образцы получают с помощью ультрамикротомы со 10
стеклянным или алмазным ножом, предварительно заливая их в пластиковую смолу. После чего биологические объекты с целью получения контраста, для верификации 15
структур клетки, подвергаются окрашиванию, с использованием уранилацетата и цитрата свинца. Затем исследование окрашенного образца проводят с помощью электронно-оптических элементов трансмиссионно-электронного микроскопа. Окончательное черно-белое изображение формируется на флуоресцентном экране, фотопленке или 20
полупроводниковых детекторах, так как воздействие электронов вызывает излучение света (Tizro P, Choi C, Khanlou N. Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy. 25
Methods Mol Biol. 2019;1897:417-424. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_33. PMID: 30539461).

Результаты анализа структурных образований клетки, изложенные в научных трудах, обычно носят описательный и сравнительный метод подачи информации. С учётом того, что первый электронный микроскоп был создан в Германии в 1931 году физиком 20
Эрнст Руска и инженером-электриком Макс Кнолль (The Nobel Prize in Physics 1986. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. Tue. 24 Jan 2023. <<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1986/summary/>>), на сегодняшний день накоплен достаточный опыт использования и анализа изображений при помощи данного метода исследования. Так, 25
изучены и описаны не только структурные компоненты клеток и тканей, но и их изменения, отражающие функциональное состояние клетки и тканей. Так известно, что:

- ядро - двумембранная органелла, которая имеет ядерную мембрану, кариоплазму или кариолемму, хроматин, ядрышко. Пристальное внимание всех исследователей 30
всегда обращается на наличие активного и неактивного хроматина и его распределение в кариоплазме, что отражает биосинтетическую активность ядра (Fabrice TN, Cherkezyan L, Ringli C, Baroux C. Transmission Electron Microscopy Imaging to Analyze Chromatin Density Distribution at the Nanoscale Level. Methods Mol Biol. 2018;1675:633-651. doi: 10.1007/978- 35
1-4939-7318-7_34. PMID: 29052215). В свою очередь контуры ядра и перинуклеарное пространство являются прямым отражением процессов механотрансдукции в клетке, что также может влиять на динамичность хроматина, с учетом того, что типичное 40
расположение гетерохроматина - периферия, а эухроматина - центр. Так, изменения в расположении генетического материала влияют на транскрипцию и еще больше могут воздействовать на биосинтез белка (Atsushi M., Mohammad R.K.M. On the nuclear pore complex and its emerging role in cellular mechanotransduction // APL Bioengineering. 2022. Vol. 6. P. 011504. doi: 10.1063/5.0080480).

- цитоплазма состоит из гиалоплазмы, органелл и включений. Следует отметить, что анализ литературы показал, что представительность органелл напрямую зависит от 45
функции клетки. Митохондрии и эндоплазматическая сеть являются органеллами, представляющими особый интерес для тех, кто исследует нарушения обмена веществ. Так, митохондрии являются важным звеном во многих метаболических путях, отвечая за выработку клеточной энергии, кристы - производные внутренней мембраны митохондрии - принимают участие в механизмах индукции апоптоза и гибели клеток, а также в синтезе и потреблении активных форм кислорода (Brand, M.; Orr, A.;

Perevoshchikova, I.; Quinlan, C. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *Br. J. Dermatol.* 2013, 169, 1-8). Количество митохондрий может увеличиваться, а их размер уменьшаться при активации работы клетки (Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Цомартова Д.А. Возрастные изменения структуры митохондрий - регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс. *Клин. эксп. морфология.* 2020; 9(1): 64-70. doi: 10.31088/SEM2020.9.1.64-70). Эндоплазматическая сеть выполняет ключевую роль в метаболизме липидов, синтезе белков и в гомеостазе кальция. При этом за метаболизм липидов и депонирование кальция отвечает агранулярная эндоплазматическая сеть, представленная преимущественно канальцами, а за биосинтез белка - гранулярная эндоплазматическая сеть, состоящая из «листочков» - вытянутых, уплощенных цистерн (Schwarz, D.S.; Blower, M.D. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016, 73, 79-94). Причем метаболизм липидов - это сложный, многоэтапный процесс, который включает взаимодействие липидов или их источника в клетках - липидных включений, митохондрий и агранулярной эндоплазматической сети (Baumann O., Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *International Review of Cytology.* 2001. Vol. 205:149-214).

Следует также отметить, что в организме существуют разные виды клеток и тканей, которые имеют свои особенности. Так, в эндокриноцитах могут быть развиты микроворсинки, которые характерны для тироцитов (Махмуров А. М., Юлдашева М. А., Юлдашев А. Ю. Ультраструктура клеток фолликулов щитовидной железы при гипо- и гиперкальциемии // *Вестник экстренной медицины.* 2019. 12(2). С. 55-60). Для синтеза стероидных гормонов эпителиоцитами обязательными структурами являются липидные включения, агранулярная эндоплазматическая сеть и митохондрии. (Yu J., Zhang L., Li Y., Zhu X., Xu S., Zhou X., Wang H., Zhang H., Liang B., Liu P. The Adrenal Lipid Droplet is a New Site for Steroid Hormone Metabolism Proteomics. 2018. Volume 18. Issue 23. 1800136. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800136>). При этом увеличение митохондрий малого размера является признаком активации стероидогенеза, а увеличение митохондрий крупного размера свидетельствует о его снижении (Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Цомартова Д.А. Возрастные изменения структуры митохондрий - регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс. *Клин. эксп. морфология.* 2020; 9(1): 64-70. doi:10.31088/SEM2020.9.1.64-70). Тесный контакт между митохондриями, агранулярной эндоплазматической сетью и липидными включениями также является признаком активации стероидогенеза (Bassi G., Sidhu S.K., Mishra S. The Expanding Role of Mitochondria, Autophagy and Lipophagy in Steroidogenesis. *Cells.* 2021; 10(8):1851. <https://doi.org/10.3390/cells10081851>). Так, количество липидных включений взаимосвязанных с агранулярной эндоплазматической сетью и митохондриями, как источника холестерина, уменьшается при активации стероидогенеза и увеличивается соответственно при снижении стероидогенеза (Shen WJ, Azhar S, Kraemer FB. Lipid droplets and steroidogenic cells. *Exp Cell Res.* 2016 Jan 15;340(2):209-14. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.11.024. Epub 2015 Nov 27. PMID: 26639173; PMCID: PMC4744538). С целью синтеза гормонов, в нейронах характерными органеллами являются ядро, митохондрии, гранулярная эндоплазматическая сеть, клеточная мембрана (Tao-Cheng JH. Stimulation-induced structural changes at the nucleus, endoplasmic reticulum and mitochondria of hippocampal neurons. *Mol Brain.* 2018 Jul 27;11(1):44. doi: 10.1186/s13041-018-0387-2. PMID: 30049284; PMCID: PMC6062868), в макрофагах - клеточная мембрана и лизосомы (Ryter A. Relationship

between ultrastructure and specific functions of macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1985;8(2):119-33. doi: 10.1016/0147-9571(85)90039-6. PMID: 3910340), в кардиомиоцитах - митохондрии, гладкая эндоплазматическая сеть, миофибриллы (Kurooka P, Dobrzyński M, Gamian A, Gostomska-Pampuch K, Kuryszko J, Całkosiński I. Effect of Glucocorticoids on Ultrastructure of Myocardial Muscle in the Course of Experimentally Induced Acute Myocardial Ischemia. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2108497. doi: 10.1155/2017/2108497. Epub 2017 Jul 16. PMID: 28791300; PMCID: PMC5534268). Поэтому данные морфологические характеристики следует учитывать для комплексного анализа структурно-функциональных особенностей клетки не только в целом, но и индивидуально.

Эндокринная система является одной из систем, поддерживающих гомеостаз организма (Johnson D. Review of endocrine physiology. *Semin Perioper Nurs.* 1998 Jul;7(3): 142-51. PMID: 9801667), а также одной из первых реагирует на воздействия патологических факторов (Knight J Endocrine system I: overview of the endocrine system and hormones. *Nursing Times (online)*; 2021. 117: 5, 38-42). Среди ее органов особое место занимают надпочечники, которые образованы корковым и мозговым веществом (Бондырева Л. А. Сравнительно-видовая морфология надпочечных желез млекопитающих. *Вестник алтайского государственного аграрного университета.* 2019. 2 (172): 153-155). Корковое вещество образовано эндокриноцитами, имеющими общий источник происхождения - промежуточную мезодерму (Pignatti E, du Toit T, Flück CE. Development and function of the fetal adrenal. *Rev Endocr Metab Disord.* 2023 Feb;24(1):5-21. doi: 10.1007/s11154-022-09756-3. Epub 2022 Oct 18. PMID: 36255414; PMCID: PMC9884658). Они способны синтезировать стероидные гормоны из холестерина (Baranowski ES, Arlt W, Idkowiak J. Monogenic Disorders of Adrenal Steroidogenesis. *Horm Res Paediatr.* 2018;89 (5):292-310. doi: 10.1159/000488034. Epub 2018 Jun 6. PMID: 29874650; PMCID: PMC6067656), которые необходимы для регуляции метаболизма, поддержания баланса, иммунного ответа и полового созревания (Pitsava G, Maria AG, Faucz FR. Disorders of the adrenal cortex: Genetic and molecular aspects. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Aug 29;13:931389. doi: 10.3389/fendo.2022.931389. PMID: 36105398; PMCID: PMC9465606). Согласно литературным данным типичные эндокриноциты, формирующие клубочковую, пучковую и сетчатую зоны в корковом веществе надпочечников имеют общий план ультрамикроскопического строения, что связано с метаболизмом холестерина, как общего источника стероидных гормонов для всех трех зон (Yu J., Zhang L., Li Y., Zhu X., Xu S., Zhou X., Wang H., Zhang H., Liang B., Liu P. The Adrenal Lipid Droplet is a New Site for Steroid Hormone Metabolism Proteomics. 2018. Volume 18. Issue 23. 1800136. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800136>). Так, ядро эндокриноцитов располагается в центре каждой клетки и имеет круглую или овальную форму, а также выраженное ядрышко (Bourne G.H., Danielli J.F. The Adrenal Cortex of Normal Adult Vertebrates. *International Review of Cytology.* Chapter 1. 1986. Volume 98. Pages 1-78. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61909-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61909-9)). Перинуклеарное пространство на большей своей протяженности не визуализируется, а гетерохроматин располагается под кариолеммой (Finol HJ, Garcia-Lunardi E, González R, Girón ME, Uzcátegui NL, Rodríguez-Acosta A. Qualitative and Quantitative Study of the Changes in the Ultrastructure of Mammalian Adrenal Cortex Caused by the Venezuelan Tigrá Mariposa (*Bothrops venezuelensis*) Snake Venom. *J Microsc Ultrastruct.* 2020 Sep 10;8(3):104-114. doi: 10.4103/JMAU.JMAU_49_19. PMID: 33282685; PMCID: PMC7703017). Митохондрии занимают 25-42% объема цитоплазмы, агранулярная эндоплазматическая сеть - 35-50%, а липидные капли - 5-15% соответственно. Следует отметить, что данные структуры клетки равномерно распределены вокруг ядра и контактируют друг с другом. Круглые или овальной формы митохондрии содержат

тубулярные кристы в клубочковой зоне и везикулярные - в пучковой и сетчатой зонах, причем в сетчатой зоне могут определяться единичные полиламинарные митохондрии, что означает наличие как пластинчатых, так и везикулярных крист в одной митохондрии. Липидные включения представляют собой образования цитоплазмы сферической формы, окруженные мембраной, разных размеров и чаще однородной электронной плотности. Агранулярная эндоплазматическая сеть представлена анастомозирующими трубочками и пузырьками, которые на электронограммах выглядят как сетчатая структура (Bourne G.H., Danielli J.F. The Adrenal Cortex of Normal Adult Vertebrates. International Review of Cytology. Chapter 1. 1986. Volume 98. Pages 1-78. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61909-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61909-9)).

Морфологические методы являются обязательными для комплексной оценки структурно-функциональных изменений надпочечников в целом, и корковых эндокриноцитов в частности (Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Цомартова Д.А. Возрастные изменения структуры митохондрий - регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс. Клин. эксп. морфология. 2020; 9(1): 64-70. doi:10.31088/СЕМ2020.9.1.64-70). Одним из уникальных методов визуализации и оценки структурных компонентов корковых эндокриноцитов является трансмиссионно-электронная микроскопия (Zamfir C, Indrei A. Particularități ultrastructurale ale glandei suprarenale [Ultrastructural characteristics of the adrenal gland]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2000 Jul-Sep;104(3):91-3. Romanian. PMID: 12089934). При этом количественные методики - это объективный способ оценки структурных особенностей клетки на ультрамикроскопическом уровне, в том числе и корковых эндокриноцитов надпочечников. Следует отметить, что способы для количественного анализа структур клетки в подавляющем большинстве случаев разрабатываются зарубежными учеными. Так, в предложенных методиках фигурируют то одни, то другие количественные данные, которые позволяют дать числовую характеристику только части органелл в разных клетках.

Поэтому одной из важных задач современной медицины и морфологии является поиск методов объективной оценки ультрамикроскопических особенностей разных клеток, с учетом их структурно-функциональных особенностей.

В России способы объективной оценки клеток являются не только единичными, но и фрагментарными. Они не учитывают ультраструктурных особенностей, характерных только для этой клетки, а также данные способы являются неспецифическими, общего назначения, то есть одна и та же методика используется для разных видов клеток. При этом, способа оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на электронограммах нет.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2023 гг. Анализ документов производился по направлению: способ оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на электронограммах. Источник информации: сайт Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на электронограммах, с помощью присвоения цифровых значений морфологическим характеристикам структурных образований данных клеток.

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что чаще всего используют стандартизированный подход к анализу изображений, полученных с помощью трансмиссионно-электронного микроскопа с использованием программы для анализа

изображений ImageJ, также известный как Fiji и разработанной National Institutes of Health - НИИ. Используя данное программное обеспечение в зарубежной литературе

подробно описан способ измерения митохондрий и митохондриально-эндоплазматического взаимодействия (далее МЭВ) в миосателитоцитах мышечных волокон (Lam J, Katti P, Biete M, Mungai M, AshShareef S, Neikirk K, Garza Lopez E, Vue Z, Christensen TA, Beasley HK, Rodman TA, Murray SA, Salisbury JL, Glancy B, Shao J, Pereira RO, Abel ED, Hinton A Jr. A Universal Approach to Analyzing Transmission Electron Microscopy with ImageJ. *Cells*. 2021 Aug 24;10(9):2177. doi: 10.3390/cells10092177. PMID: 34571826; PMCID: PMC8465115), который в свою очередь и был выбран за прототип.

Согласно указанному способу для проведения морфометрического анализа органелл использовали стандартный протокол, включающий фиксацию кусочков тканей с миосателитоцитами в 2,5% раствора глутаральдегида, а затем в 1% растворе осмия тетроксидом на фосфатном буфере, обезвоживание с помощью этилового спирта возрастающей крепости и абсолютного ацетона. Обезвоженные образцы помещали в смесь «Эпон-аралдит» и выдерживали в термостате при 60°C 36 часов. Полученные срезы толщиной 1-2 мкм на ультрамикротоме с последующим контрастированием в растворах уранилацетата и цитрата свинца изучали под микроскопом и фотографировали выбранные участки с целью получения черно-белых снимков - электронограмм с помощью трансмиссионного электронного микроскопа с обязательным наличием большого увеличения порядка 30000.

Для морфометрии использовали программное обеспечение ImageJ, разработанное для анализа многомерных научных изображений, в том числе и для трансмиссионной электронной микроскопии (Lam J, Katti P, Biete M, Mungai M, AshShareef S, Neikirk K, Garza Lopez E, Vue Z, Christensen TA, Beasley HK, Rodman TA, Murray SA, Salisbury JL, Glancy B, Shao J, Pereira RO, Abel ED, Hinton A Jr. A Universal Approach to Analyzing Transmission Electron Microscopy with ImageJ. *Cells*. 2021 Aug 24;10(9):2177. doi: 10.3390/cells10092177. PMID: 34571826; PMCID: PMC8465115). Так, полученные в ходе эксперимента, электронограммы на большом увеличении загружали в программу. Затем с помощью панели инструментов измеряли длину, ширину, площадь митохондрии, размер крист и их количество, а также по формуле, заложенной в программе, определяли объем органеллы. Для оценки МЭВ измеряли контактную длину, а именно участок прилегания мембраны митохондрии и мембраны эндоплазматической сети и расстояние между мембранами митохондрии и эндоплазматической сети в участке их контакта. Далее рассчитывали процент покрытия, а именно длину контакта, поделенную на площадь митохондриальной поверхности, после чего полученное значение нужно было умножить на 100, чтобы получить процентное соотношение. Затем самостоятельно предполагались причины данных структурных особенностей в митохондриях и МЭВ, основываясь на механизмах изучаемого процесса или воздействия.

Недостатком данного способа является то, что он не позволяет оценить состояние не только клетки в целом, но и коркового эндокриноцита в частности, с точки зрения не только количественных, но и качественных изменений в клетке при воздействии на нее внешних факторов, требует изготовления нескольких снимков на разных увеличениях, с обязательным наличием большого увеличения порядка 30000, необходимость использования программного обеспечения ImageJ, а также невозможность оценить на электронограммах функциональное состояние структурных образований клеток, а именно корковых эндокриноцитов.

Учитывая общий источник развития, синтез стероидных гормонов, а также сходный принцип строения корковых эндокриноцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон

можно разработать общий подход к количественному анализу ультраструктурных особенностей строения для всех корковых эндокриноцитов надпочечников.

Задачей настоящего изобретения является создание способа оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на электронограммах с учетом характеристик структурных образований данных клеток.

Технический результат использования изобретения - возможность получения однозначного вывода о функциональном состоянии коркового эндокриноцита надпочечника: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция, за счет определения суммы цифровых значений в баллах, присвоенных морфологическим признакам структурных образований данных клеток на электронограммах, следующим образом:

- ядро оценивают от 0 до 2 баллов, где 0 - ядро отсутствует; 1 - ядро неправильной формы; 2 - форма ядра круглая или овальная;

- целостность и конфигурацию кариолеммы (далее К) от 0 до 4 баллов, где 0 - нарушена целостность кариолеммы; 1 - кариолемма целая, более 60% ее протяженности имеют впячивания разного размера; 2 - кариолемма целая, менее 60% ее протяженности имеют впячивания разного размера; 3 - кариолемма целая, более 50% ее протяженности имеют однообразные волнообразной формы контуры; 4 - кариолемма целая, менее 50% ее протяженности имеют однообразные волнообразной формы контуры или имеются ровные контуры на всем протяжении кариолеммы;

- целостность и степень выраженности расстояния между внутренней и наружной мембраной ядра, то есть перинуклеарное пространство (далее Пп) оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 - Пп отсутствует из-за нарушения целостности кариолеммы; 1 - Пп визуально различается, имеет вид неравномерно расширенной щели на более чем 50% протяженности кариолеммы; 2 - Пп визуально различается, имеет вид неравномерно расширенной щели на менее 50% протяженности кариолеммы или равномерно расширенной щели на более чем 50% протяженности кариолеммы; 3 - Пп визуально различается, имеет вид равномерно расширенной щели на 10-49% протяженности кариолеммы; 4 - Пп визуально не различается, из-за близкого расположения наружной и внутренней мембран ядра на протяжении более 90%;

- наличие ядрышка и его структура (далее Я) оценивают от 0 до 2 баллов, где 0 - отсутствует ядрышко; 1 - имеется ядрышко, однородной электронной плотности; 2 - имеется ядрышко, ячеистой структуры;

- наличие хроматина, а именно гетерохроматина и эухроматина (далее Х) в ядре оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствует хроматин, то есть ядро разрушено и/или гетерохроматин представлен фрагментами, которые не формируют хромосомы и/или ядро фрагментируется; 1 - присутствует гетерохроматин в виде хромосом в разных фазах митотического деления; 2 - хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает более 80% кариоплазмы; 3 - хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает 50-79% кариоплазмы; 4 - хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает менее 20% кариоплазмы; 5 - хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает 20-49% кариоплазмы;

- наличие или отсутствие агранулярной эндоплазматической сети (далее аЭПС), с учетом просвета в ее канальцах, оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствует аЭПС, т.е. мембранная органелла разрушена; 1 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, неравномерно расширенные, с электронно-светлым содержимым или определяются фрагменты канальцев со щелевидным просветом, занимающие не менее 10% цитоплазмы или встречаются канальцы в форме «озера» растянутые и/или

частично разрушенные и занимающие более 35% цитоплазмы; 2 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым, занимающие 10-20% цитоплазмы или встречаются канальцы в форме «озера» растянутые и/или частично разрушенные, занимающие менее 35% цитоплазмы; 3 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым, занимающие 21-34% цитоплазмы; 4 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, равномерно или неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым между органеллами, занимающие более 50% цитоплазмы; 5 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, равномерно или неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым между органеллами, занимающие 35-50% цитоплазмы;

- наличие, размеры и содержимое митохондрий (далее М) оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствуют митохондрии, так как не определяются в поле зрения и/или разрушены и/или имеется только наружная мембрана, а содержимое разрушено у более чем 50% митохондрий клетки; 1 - митохондрии имеются, при этом крупные размеры у более чем 50% митохондрий, а кристы четко не дифференцируются у 25-49% митохондрий клетки, при этом матрикс электронно-плотный и/или определяются полиморфные кристы с расширенными промежутками между ними и/или кристы определяются в виде фрагментов в электронно-светлом матриксе у более 50%; 2 - митохондрии имеются, мелких размеров у более 50% митохондрий и кристы не дифференцируются у более чем 25-49% митохондрий клетки, при этом матрикс электронно-плотный и/или определяются полиморфные кристы с расширенными промежутками между ними и/или кристы определяются в виде фрагментов в электронно-светлом матриксе; 3 - имеются митохондрии, обладают полиморфностью, где единичны случаи с нарушением мембраны и/или единичные случаи с разными формами крист и/или с электронно-темным матриксом без четкой дифференцировки крист и/или с электронно-светлым матриксом, где различимы целые и разрушенные кристы; 4 - имеются митохондрии мелких размеров более 50%, в которых кристы дифференцируются в более 75% матрикса; 5 - имеются митохондрии разных размеров, которые содержат целые кристы в более 75% матрикса;

- наличие и особенности расположения липидных включений (далее Лв) оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствуют Лв; 1 - присутствуют Лв, располагаются группами и занимают более 79% цитоплазмы клетки; 2 - присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают 50-74% цитоплазмы клетки; 3 - присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают 16-49% цитоплазмы клетки; 4 - присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают менее 5% цитоплазмы клетки; 5 - присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают 5-15% цитоплазмы клетки;

- взаимный контакт мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений (далее ВкМаЭПСЛв) оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 - отсутствует ВкМаЭПСЛв, так как митохондрии и/или аЭПС и/или липидные включения разрушены или не определяются в цитоплазме и/или разделены участками цитоплазмы разной электронной плотности друг от друга; 1 - присутствует ВкМаЭПСЛв, где до 30% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 2 - присутствует, где 31-60% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 3 - присутствует ВкМаЭПСЛв, где более 95% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 4 - присутствует ВкМаЭПСЛв, где 61-95% липидных

включений контактируют с мембранами митохондрий;

- далее определяют сумму в баллах цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам вышеуказанных структурных образований коркового эндокриноцита, и оценивают функциональное состояние клетки: митоз - в случае, когда сумма баллов равна 1-8, гипофункция - в случае, когда сумма баллов равна 9-23, гиперфункция - в случае, когда сумма баллов равна 24-31, нормальная функция - в случае, когда сумма баллов равна 32-36 баллов. Диапазоны определены по характеристикам указанных выше структурных образований коркового эндокриноцита и распределены в зависимости от соответствия его функционального состояния: нормальная функция или гиперфункция, или гипофункция, или митоз клетки на основании известных из уровня техники исследований, где морфологические признаки ядра, кариолеммы, перинуклеарного пространства, ядрышка, хроматина, агранулярной эндоплазматической сети, митохондрий, липидных включений и взаимный контакт мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений, являются специфическими для разных функциональных состояний. Например, для хроматина при нормальной функции могут иметь место характеристики, соответствующие 5 баллам, при гипофункции - 2 или 3 баллам, при гиперфункции - 4 баллам, при митозе - 1 баллу. Следовательно, каждому функциональному состоянию коркового эндокриноцита будет соответствовать диапазон от минимальной до максимальной суммы баллов, присвоенных указанным выше структурным образованиям этой клетки на основании изображения, полученного на электронограмме.

Новизна и изобретательский уровень заявленного способа заключаются в том, что не известна оценка функциональной активности коркового эндокриноцита надпочечника по сумме цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований данной клетки.

Технический результат достигается путем заявленного способа, включающего подготовку образцов для исследования путем фиксации кусочков тканей с клетками в 2,5% растворе глутаральдегида, а затем в 1% растворе осмия тетроксидом на фосфатном буфере, обезвоживание с помощью этилового спирта возрастающей крепости и абсолютного ацетона, после чего обезвоженные образцы помещают в смесь «Эпон-аралдит» и выдерживают в термостате при 60°C 36 часов, получают срезы толщиной 1-2 мкм на ультрамикротоме с последующим контрастированием в растворах уранилацетата и цитрата свинца, фотографируют выбранные участки с получением черно-белых снимков - электронограмм путем трансмиссионно-электронной микроскопии, в который внесены следующие новые признаки:

- для исследования готовят кусочки коркового вещества надпочечника с эндокриноцитами,
 - выбирают не менее 10 клеток в поле зрения случайным выбором на срезе коркового вещества надпочечника на увеличении 8000 и фотографируют с получением электронограммы;

- морфологические характеристики структурных образований выбранных клеток на электронограммах оценивают в баллах, руководствуясь принципом «от худшего к лучшему»: так, наименьшее цифровое значение - 0 баллов, присваивают той морфологической характеристике, которая максимально изменяет морфологию типичной органеллы коркового эндокриноцита, а наибольшее цифровое значение в баллах присваивают той морфологической характеристике, которая по структуре полностью соответствует норме;

- проводят оценку функциональной активности: митоз или гиперфункция или

гипофункция или нормальная функция корковых эндокриноцитов путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований данных клеток на электронограммах, при этом:

- 5 - ядро оценивают от 0 до 2 баллов, где 0 - ядро отсутствует; 1 - ядра неправильной формы; 2 - форма ядра круглая или овальная;
- целостность и конфигурацию кариолеммы (далее К) оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 - нарушена целостность кариолеммы; 1 - кариолемма целая, более 60% ее протяженности имеют впячивания разного размера; 2 - кариолемма целая, менее 60% ее протяженности имеют впячивания разного размера; 3 - кариолемма целая, более 10 50% ее протяженности имеют однообразные волнообразной формы контуры; 4 - кариолемма целая, менее 50% ее протяженности имеют однообразные волнообразной формы контуры или имеются ровные контуры на всем протяжении кариолеммы;
- целостность и степень выраженности расстояния между внутренней и наружной мембраной ядра, то есть перинуклеарное пространство (далее Пп) оценивают от 0 до 15 4 баллов, где 0 - Пп отсутствует из-за нарушения целостности кариолеммы; 1 - Пп визуально различается, имеет вид неравномерно расширенной щели на более чем 50% протяженности кариолеммы; 2 - Пп визуально различается, имеет вид неравномерно расширенной щели на менее 50% протяженности кариолеммы или равномерно расширенной щели на более чем 50% протяженности кариолеммы; 3 - Пп визуально 20 различается, имеет вид равномерно расширенной щели на 10-49% протяженности кариолеммы; 4 - Пп визуально не различается, из-за близкого расположения наружной и внутренней мембран ядра на протяжении более 90%;
- наличие ядрышка и его структуру (далее Я) оценивают от 0 до 2 баллов, где 0 - отсутствует ядрышко; 1 - имеется ядрышко, однородной электронной плотности; 2 - 25 имеется ядрышко, ячеистой структуры;
- наличие хроматина, а именно гетерохроматина и эухроматина (далее Х) в ядре оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствует хроматин, то есть ядро разрушено и/или гетерохроматин представлен фрагментами, которые не формируют хромосомы и/или ядро фрагментируется; 1 - присутствует гетерохроматин в виде хромосом в разных 30 фазах митотического деления; 2 - хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает более 80% кариоплазмы; 3 - хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает 50-79% кариоплазмы; 4 - хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает менее 20% кариоплазмы; 5 - хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает 20-49% кариоплазмы;
- 35 - наличие или отсутствие агранулярной эндоплазматической сети (далее аЭПС), с учетом просвета в ее канальцах, оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 - аЭПС отсутствует, т.е. мембранная органелла разрушена; 1 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, неравномерно расширенные, с электронно-светлым содержимым или определяются фрагменты канальцев со щелевидным просветом, занимающие на 40 менее 10% цитоплазмы или встречаются канальцы в форме «озера» растянутые и/или частично разрушенные и занимающие более 35% цитоплазмы; 2 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым, занимающие 10-20% цитоплазмы или встречаются канальцы в 40 форме «озера» растянутые и/или частично разрушенные, занимающие менее 35% цитоплазмы; 3 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, 45 неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым, занимающие 21-34% цитоплазмы; 4 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, равномерно или неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым между

органеллами, занимающие более 50% цитоплазмы; 5 - присутствует аЭПС, дифференцируются просветы канальцев, равномерно или неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым между органеллами, занимающие 35-50% цитоплазмы;

5 - наличие, размеры и содержимое митохондрий (далее М) оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствуют митохондрии, так как не определяются в поле зрения и/или разрушены и/или имеется только наружная мембрана, а содержимое разрушено у более чем 50% митохондрий клетки; 1 - имеются митохондрии, при этом крупные размеры у более чем 50% митохондрий, а кристы четко не дифференцируются у 25-49%

10 митохондрий клетки, при этом матрикс электронно-плотный и/или определяются полиморфные кристы с расширенными промежутками между ними и/или кристы определяются в виде фрагментов в электронно-светлом матриксе у более 50%; 2 - имеются митохондрии, мелких размеров у более 50% митохондрий и кристы не дифференцируются у 25-49% митохондрий клетки, при этом матрикс электронно-плотный и/или определяются полиморфные кристы с расширенными промежутками между ними и/или кристы определяются в виде фрагментов в электронно-светлом матриксе; 3 - имеются митохондрии, обладают полиморфностью, где единичны случаи с нарушением мембраны и/или единичные случаи с разными формами крист и/или с электронно-темным матриксом без четкой дифференцировки крист и/или с электронно-светлым матриксом, где различимы целые и разрушенные кристы; 4 - имеются митохондрии мелких размеров более 50%, в которых кристы дифференцируются в более 75% матрикса; 5 - имеются митохондрии разных размеров, которые содержат целые кристы в более 75% матрикса;

25 - наличие и особенности расположения липидных включений (далее Лв) оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствуют Лв; 1 - присутствуют Лв, располагаются группами и занимают более 79% цитоплазмы клетки; 2 - присутствуют, располагаются группами и/или поодиночке и занимают 50-74% цитоплазмы клетки; 3 - присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают 16-49% цитоплазмы клетки; 4 - присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают менее 5% цитоплазмы клетки; 5 - присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают 5-15% цитоплазмы клетки;

35 - взаимный контакт мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений (далее ВкМаЭПСЛв) оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 - отсутствует ВкМаЭПСЛв, так как митохондрии и/или аЭПС и/или липидные включения разрушены или не определяются в цитоплазме и/или разделены участками цитоплазмы разной электронной плотности друг от друга; 1 - присутствует ВкМаЭПСЛв, где до 30% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 2 - присутствует ВкМаЭПСЛв, где 31-60% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 3 - присутствует ВкМаЭПСЛв, где более 95% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 4 - присутствует ВкМаЭПСЛв, где 61-95% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий;

45 - далее определяют сумму цифровых значений в баллах, присвоенных морфологическим характеристикам вышеуказанных структурных образований коркового эндокриноцита, и оценивают функциональное состояние клетки: митоз - в случае, когда сумма баллов равна 1-8, гипофункция - 9-23, гиперфункция - 24-31, нормальная функция - 32-36 баллов.

Изобретение характеризуется следующими фигурами:

Фиг. 1. Таблица «Зависимость функционального состояния коркового эндокриноцита

от выявленных на электронограмме характеристик, входящих в него структурных образований», с указанием диапазона присвоенных цифровых значений в баллах для каждого структурного образования клетки и распределением в таблице в соответствии с принадлежностью их к функциональному состоянию - нормальная функция или гиперфункция, или гипофункция, или митоз клетки - на основании известных из уровня техники морфологических признаков структурных образований: ядра, кариолеммы, перинуклеарного пространства, ядрышка, хроматина, агранулярной эндоплазматической сети, митохондрий, липидных включений и взаимному контакту мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений, где: мин - минимальное значение в баллах, макс - максимальное значение в баллах для данного состояния коркового эндокриноцита.

Фиг. 2. Электронограмма по примеру 1 участка коркового вещества надпочечника от крысы 41, где КЭнПЗ - корковый эндокриноцит пучковой зоны надпочечника, Я - ядрышко, Х - гетерохроматин, аЭПС - агранулярная эндоплазматическая сеть, М - митохондрии, Лв - липидное включение, К - кариолемма, Пп - перинуклеарное пространство, ВкМаЭПСЛв - взаимный контакт мембран митохондрии, агранулярной эндоплазматической сети и липидного включения. Увеличение $\times 8000$.

Фиг. 3. Электронограмма по примеру 2 участка коркового вещества надпочечника от крысы 29, где КЭнСЗ - корковый эндокриноцит сетчатой зоны надпочечника, Х - хромосомы, расположенные в виде одного электронно-плотного вытянутого волнообразного скопления в центре клетки - метаэпифизарная пластинка, аЭПС - агранулярная эндоплазматическая сеть. Увеличение $\times 8000$.

Фиг. 4. Электронограмма по примеру 3 участка коркового вещества надпочечника от крысы 5, где КЭнКЗ - корковый эндокриноцит клубочковой зоны надпочечника, Х - гетерохроматин, аЭПС - агранулярная эндоплазматическая сеть, М - митохондрии, Лв - липидное включение, К - кариолемма, Пп - перинуклеарное пространство, ВкМаЭПСЛв - взаимный контакт мембран митохондрии, агранулярной эндоплазматической сети и липидного включения. Увеличение $\times 8000$.

Фиг. 5. Электронограмма по примеру 4 участка коркового вещества надпочечника от крысы 18, где КЭнПЗ - корковый эндокриноцит пучковой зоны надпочечника, Я - ядрышко, Х - гетерохроматин, аЭПС - агранулярная эндоплазматическая сеть, М - митохондрии, Лв - липидное включение, К - кариолемма, Пп - перинуклеарное пространство, ВкМаЭПСЛв - взаимный контакт мембран митохондрии, агранулярной эндоплазматической сети и липидного включения. Увеличение $\times 8000$.

Способ осуществляют следующим образом:

Для осуществления предложенного способа оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на электронограммах был проведен анализ электронограмм корковых эндокриноцитов надпочечников 48 половозрелых крыс-самцов массой 200-210 грамм, полученных из вивария ГУ «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки». В ходе проведения эксперимента 48 животных разделили на 8 групп по 6 особей в каждой группе. Каждую группу животных разместили в отдельных клетках, предварительно присвоив номер каждому животному от 1 до 48. Затем каждую клетку, в которой располагалось по 6 крыс из одной группы кодировали, присваивая буквенное значение Х и номер, соответствующий воздействию. Первой и второй группам по 6 особей в каждой ежедневно в течение 60-ти дней при помощи желудочного зонда вводился 1 мл раствора бензоата натрия в дозировке 1000 мг/кг массы тела соответственно. Указанная доза бензоата натрия является двумя предельно допустимыми суточными концентрациями для крыс. При ее расчете за основу

были взяты предельно допустимая суточная концентрация бензоата натрия для человека и пересчитана в соответствии с рекомендациями Рыболовлевых для крыс с учетом константы биологической активности (Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности. Доклады АН СССР. 1979;247(6):1513-1516).

Крысам третьей и четвертой групп в аналогичных условиях и сроках как в 1-й и 2-й группах - вводили бензоата натрия в дозе 1000 мг/кг массы тела и мексидол в дозе 50 мг/кг массы тела, учитывая тот факт, что основным механизмом неблагоприятного воздействия бензоата натрия является инициация оксидативного стресса клеток и реакций перекисного окисления липидов их биомембран, а мексидол способен корректировать разные звенья патогенеза оксидативного стресса путем уменьшения уровня малонового диальдегида, обезвреживать продукты перекисного окисления липидов и активные формы кислорода, а также повышать активность глутатионпероксидазы и устойчивость к гипоксии (Щулькин А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики. Фарматека. 2016; s4: 65-71).

Крысам из пятой и шестой групп в аналогичных условиях и сроках вводили 1 мл 0,9% изотонического раствора натрия хлорида, с последующим нанесением сквозного дырчатого дефекта в проксимальном отделе диафизов большеберцовых костей при помощи стоматологического бора, с целью моделирования стрессовой ситуации для организма при нанесении травмы. Крысам из седьмой и восьмой групп в аналогичных условиях и сроках вводили 1 мл 0,9% изотонического раствора натрия хлорида. Содержание и манипуляции над животными проводились в соответствии с правилами содержания экспериментальных животных, установленной Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза. Протокол исследования утвержден на заседании комиссии по биоэтике ГУ «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки», протокол №2 от 25.03.2022 г. Затем, все исследования клеток на электронограммах проводили с использованием слепого метода.

Пример 1.

У крысы 41, выбранной случайным образом из клетки с шестью животными, маркированной кодом X7, после выведения из эксперимента на третьи сутки наблюдения, извлекли надпочечник и измельчили на кусочки его корковое вещество. Подготовку к эксперименту проводили путем фиксации кусочков коркового вещества надпочечника в 2,5% растворе глутаральдегида, а затем в 1% растворе осмия тетроксидом на фосфатном буфере, после чего обезвоживали с помощью этилового спирта возрастающей крепости и абсолютного ацетона, затем обезвоженные образцы помещали в смесь «Эпон-аралдит» и выдерживали в термостате при 60°C 36 часов. После этого с помощью ультрамикротомы получали срезы толщиной 1-2 мкм, с последующим контрастированием в растворах уранилацетата и цитрата свинца. Затем при помощи трансмиссионного электронного микроскопа выбирали не менее 10 клеток в поле зрения клубочковой, пучковой и сетчатой зонах случайным выбором на срезе коркового вещества надпочечника на увеличении 8000 и фотографировали с получением электронограмм корковых эндокриноцитов.

Затем в соответствии с Таблицей «Зависимость функционального состояния коркового эндокриноцита от выявленных на электронограмме характеристик, входящих в него структурных образований» (фиг. 1), присваивали баллы морфологическим характеристикам структурных образований данных клеток на электронограмме (фиг.

2) и проводили оценку функциональной активности: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция корковых эндокриноцитов путем вычисления суммы цифровых значений для анализа функционального состояния клетки под влиянием фактора X7. Для чего баллы, присвоенные структурным образованиям в корковом
 5 эндокриноците пучковой зоны, а именно ядру, кариолемме, перинуклеарному пространству, ядрышку, хроматину, агранулярной эндоплазматической сети, митохондрии, липидным включениям и взаимному контакту мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений на электронограмме, вносили в таблицу 1 «Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным
 10 характеристикам структурных образований коркового эндокриноцита», для получения суммы цифровых значений с целью определения функционального состояния структурных образований коркового эндокриноцита .

Таблица 1

Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам
 15 структурных образований коркового эндокриноцита

№ п/п	Структурные образования коркового эндокриноцита (диапазон цифровых значений в баллах)	баллы					
		0	1	2	3	4	5
1	Ядро (0-2 балла)			+			
2	К (0-4 балла)				+		
3	Пп (0-4 балла)			+			
4	Я (0-2 балла)		+				
5	X (0-5 баллов)					+	
6	аЭПС (0-5 баллов)					+	
7	М (0-5 баллов)					+	
8	Лв (0-5 баллов)					+	
9	ВМаЭЛв (0-4 балла)				+		
Сумма:			1	4	6	16	
ВСЕГО:		27 баллов					

В результате было получено 27 баллов, что согласно таблице «Зависимость функционального состояния коркового эндокриноцита от выявленных на электронограмме характеристик, входящих в него структурных образований» на фиг. 1
 35 входит в диапазон 24-31, и соответствует функциональному состоянию клетки - гиперфункция. Затем после расшифровки закодированных обозначений, выявили, что крыса 41 относилась к группе животных, которым осуществляли воздействие фактором X7 - вводили 1 мл 0,9% изотонического раствора натрия хлорида в течении 60 суток, с последующим нанесением сквозного дырчатого дефекта в проксимальном отделе
 40 диафизов большеберцовых костей, что вызвало согласно результатам способа оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на третьи сутки наблюдения гиперфункцию данной клетки пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы 41.

Пример 2.

У крысы 29, выбранной случайным образом из клетки с шестью животными, маркированной кодом X6, корковые эндокриноциты для исследования готовили как в примере 1. Проводили оценку функциональной активности: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция корковых эндокриноцитов путем вычисления

суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований данной клетки на электронограмме (фиг. 3) для анализа функционального состояния клетки под влиянием фактора X6. Структурным образованиям в корковом эндокриноците сетчатой зоны, а именно ядру, кариолемме, перинуклеарному пространству, ядрышку, хроматину, агранулярной эндоплазматической сети, митохондрии, липидным включениям и взаимному контакту мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений на электронограмме, присваивали баллы согласно заявленному способу, которые вносили в таблицу 2 «Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований коркового эндокриноцита», для получения суммы цифровых значений с целью определения функционального состояния структурных образований коркового эндокриноцита.

Таблица 2

Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований коркового эндокриноцита

№ п/п	Структурные образования коркового эндокриноцита (диапазон цифровых значений в баллах)	баллы					
		0	1	2	3	4	5
1	Ядро (0-2 балла)	+					
2	К (0-4 балла)	+					
3	Пц (0-4 балла)	+					
4	Я (0-2 балла)	+					
5	Х (0-5 баллов)		+				
6	аЭПС (0-5 баллов)		+				
7	М (0-5 баллов)	+					
8	Лв (0-5 баллов)	+					
9	ВМаЭЛв (0-4 балла)	+					
	Сумма:	0	2				
	ВСЕГО:	2 балла					

В результате было получено 2 балла, что согласно таблице «Зависимость функционального состояния коркового эндокриноцита от выявленных на электронограмме характеристик, входящих в него структурных образований» на фиг. 1 входит в диапазон 1-8, что соответствует функциональному состоянию клетки - митоз. Затем после расшифровки закодированных обозначений, выявили, что крыса 29 относилась к группе животных, которым осуществляли воздействие фактором X6 - бензоат натрия в дозе 1000 мг/кг массы тела совместно с мексидолом в дозе 50 мг/кг массы тела в течении 60 суток, что вызвало согласно результатам способа оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на двадцать четвертые сутки наблюдения митоз данной клетки сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы 29.

Пример 3.

У крысы 5, выбранной случайным образом из клетки с шестью животными, маркированной кодом X4, корковые эндокриноциты для исследования готовили как в примере 1. Проводили оценку функциональной активности: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция клеток путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований

данной клетки на электронограмме (фиг. 4) для анализа функционального состояния клетки под влиянием фактора Х4.

Структурным образованиям в корковом эндокриноците клубочковой зоны, а именно ядру, кариолемме, перинуклеарному пространству, ядрышку, хроматину, агранулярной эндоплазматической сети, митохондрии, липидным включениям и взаимному контакту мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений на электронограмме, присваивали баллы согласно заявленному способу, которые вносили в таблицу 3 «Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований коркового эндокриноцита», для получения суммы цифровых значений с целью определения функционального состояния структурных образований коркового эндокриноцита .

Таблица 3

Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований коркового эндокриноцита

№ п/п	Структурные образования коркового эндокриноцита (диапазон цифровых значений в баллах)	баллы					
		0	1	2	3	4	5
1	Ядро (0-2 балла)		+				
2	К (0-4 балла)			+			
3	Пп (0-4 балла)			+			
4	Я (0-2 балла)	+					
5	Х (0-5 баллов)			+			
6	аЭПС (0-5 баллов)			+			
7	М (0-5 баллов)	+					
8	Лв (0-5 баллов)				+		
9	ВМаЭЛв (0-4 балла)			+			
Сумма:		0	1	10	3		
ВСЕГО:		14 баллов					

В результате было получено 14 баллов, что согласно таблице «Зависимость функционального состояния коркового эндокриноцита от выявленных на электронограмме характеристик входящих в него структурных образований» на фиг.1 входит в диапазон 9-23, что соответствует функциональному состоянию клетки - гиподисфункция.

Затем после расшифровки закодированных обозначений, выявили, что крыса 5 относилась к группе животных, которым осуществляли воздействие фактором Х4 - бензоат натрия в дозе 1000 мг/кг массы тела в течении 60 суток, что вызвало согласно результатам способа оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на третьи сутки наблюдения гиподисфункцию данной клетки клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крысы 5.

Пример 4.

У крысы 18, выбранной случайным образом из клетки с шестью животными, маркированной кодом Х1, корковые эндокриноциты для исследования готовили как в примере 1. Проводили оценку функциональной активности: митоз или гипердисфункция или гиподисфункция или нормальная функция клеток путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований

данной клетки на электронограмме (фиг. 5) для анализа функционального состояния клетки под влиянием фактора X1.

Структурным образованиям в корковом эндокриноците пучковой зоны, а именно ядру, кариолемме, перинуклеарному пространству, ядрышку, хроматину, агранулярной эндоплазматической сети, митохондрии, липидным включениям и взаимному контакту мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений на электронограмме, присваивали баллы согласно заявленному способу, которые вносили в таблицу 4 «Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований коркового эндокриноцита», для получения суммы цифровых значений с целью определения функционального состояния структурных образований коркового эндокриноцита .

Таблица 4

Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований коркового эндокриноцита

№ п/п	Структурные образования коркового эндокриноцита (диапазон цифровых значений в баллах)	баллы					
		0	1	2	3	4	5
1	Ядро (0-2 балла)			+			
2	К (0-4 балла)					+	
3	Пп (0-4 балла)				+		
4	Я (0-2 балла)			+			
5	Х (0-5 баллов)						+
6	аЭПС (0-5 баллов)						+
7	М (0-5 баллов)						+
8	Лв (0-5 баллов)						+
9	ВМаЭЛв (0-4 балла)					+	
Сумма:				4	3	8	20
ВСЕГО:		35 баллов					

В результате было получено 35 баллов, что согласно таблице «Зависимость функционального состояния коркового эндокриноцита от выявленных на электронограмме характеристик, входящих в него структурных образований» на фиг. 1 входит в диапазон 32-36, что соответствует функциональному состоянию клетки - нормальная функция. Затем после расшифровки закодированных обозначений, выявили, что крыса 5 относилась к группе животных, которым осуществляли воздействие фактором X1 - вводили 1 мл 0,9% изотонического раствора натрия хлорида в течении 60 суток, что вызвало согласно результатам способа оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников на третьи сутки наблюдения нормальную функцию данной клетки пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы 18.

Таким образом, приведенные примеры показывают, что поставленная задача решена и достигнут технический результат - возможность получения однозначного вывода о функциональном состоянии корковых эндокриноцитов надпочечников: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция, за счет определения суммы цифровых значений в баллах, присвоенных морфологическим признакам структурных образований корковых эндокриноцитов на электронограммах.

Применение данного способа позволит как начинающим, так и опытным исследователям легко, быстро, объективно оценить функциональное состояние корковых эндокриноцитов надпочечников на электронограммах и определиться с дальнейшей тактикой работы с экспериментальным материалом. Это также позволит сократить время изучения полученных данных другими исследователями и исключит возможность упускать детали ультрамикроскопического строения данных органелл в корковых эндокриноцитах в эксперименте.

(57) Формула изобретения

Способ оценки функционального состояния корковых эндокриноцитов надпочечников, включающий подготовку образцов, изготовление срезов, получение черно-белых снимков – электронограмм путем трансмиссионно-электронной микроскопии, отличающийся тем, что для исследования готовят кусочки коркового вещества надпочечника с эндокриноцитами, выбирают не менее 10 клеток в поле зрения случайным выбором на срезе коркового вещества надпочечника на увеличении 8000 и фотографируют с получением электронограмм, оценивают в баллах морфологические характеристики структурных образований, таких как ядро, кариолема, перинуклеарное пространство, ядрышко и его структура, хроматин, агранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии, липидные включения, взаимный контакт мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений на электронограммах; причём наименьшее цифровое значение – 0 баллов присваивают той морфологической характеристике, которая максимально изменяет морфологию типичной органеллы коркового эндокриноцита, а наибольшее цифровое значение в баллах присваивают той морфологической характеристике, которая по структуре полностью соответствует норме, при этом:

- ядро оценивают от 0 до 2 баллов, где 0 – ядро отсутствует; 1 – ядро неправильной формы; 2 – форма ядра круглая или овальная;
- целостность и конфигурацию кариолеммы оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 – нарушена целостность кариолеммы; 1 – кариолема целая, более 60% ее протяженности имеют впячивания разного размера; 2 – кариолема целая, менее 60% ее протяженности имеют впячивания разного размера; 3 – кариолема целая, более 50% ее протяженности имеют однообразные волнообразной формы контуры; 4 – кариолема целая, менее 50% ее протяженности имеют однообразные волнообразной формы контуры или имеются ровные контуры на всем протяжении кариолеммы;
- целостность и степень выраженности расстояния между внутренней и наружной мембраной ядра, то есть перинуклеарное пространство (далее Пп) от 0 до 4 баллов, где 0 – Пп отсутствует из-за нарушения целостности кариолеммы; 1 – Пп визуально различается, имеет вид неравномерно расширенной щели на более чем 50% протяженности кариолеммы; 2 – Пп визуально различается, имеет вид неравномерно расширенной щели на менее 50% протяженности кариолеммы или равномерно расширенной щели на более чем 50% протяженности кариолеммы; 3 – Пп визуально различается, имеет вид равномерно расширенной щели на 10-49% протяженности кариолеммы; 4 – Пп визуально не различается, из-за близкого расположения наружной и внутренней мембран ядра на протяжении более 90%;
- наличие ядрышка и его структуру оценивают от 0 до 2 баллов, где 0 – отсутствует ядрышко; 1 – имеется ядрышко, однородной электронной плотности; 2 – имеется ядрышко, ячеистой структуры;
- наличие хроматина, а именно гетерохроматина и эухроматина в ядре оценивают

от 0 до 5 баллов, где 0 – отсутствует хроматин, то есть ядро разрушено и/или гетерохроматин представлен фрагментами, которые не формируют хромосомы и/или ядро фрагментируется; 1 – присутствует гетерохроматин в виде хромосом в разных фазах митотического деления; 2 – хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает более 80% кариоплазмы; 3 – хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает 50-79% кариоплазмы; 4 – хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает менее 20% кариоплазмы; 5 – хроматин присутствует, но гетерохроматин занимает 20–49% кариоплазмы;

- наличие или отсутствие агранулярной эндоплазматической сети (далее аЭПС), с учетом просвета в ее канальцах, оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 – аЭПС отсутствует, т.е. мембранная органелла разрушена; 1 – аЭПС присутствует, дифференцируются просветы канальцев, неравномерно расширенные, с электронно-светлым содержимым или определяются фрагменты канальцев со щелевидным просветом, занимающие не менее 10% цитоплазмы или встречаются канальцы в форме «озера» растянутые и/или частично разрушенные и занимающие более 35% цитоплазмы; 2 – аЭПС присутствует, дифференцируются просветы канальцев, неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым, занимающие 10-20% цитоплазмы или встречаются канальцы в форме «озера» растянутые и/или частично разрушенные, занимающие менее 35% цитоплазмы; 3 – аЭПС присутствует, дифференцируются просветы канальцев, неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым, занимающие 21-34% цитоплазмы; 4 – аЭПС присутствует, дифференцируются просветы канальцев, равномерно или неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым между органеллами, занимающие более 50% цитоплазмы; 5 – аЭПС присутствует, дифференцируются просветы канальцев, равномерно или неравномерно расширенные с электронно-светлым содержимым между органеллами, занимающие 35-50% цитоплазмы;

- наличие, размеры и содержимое митохондрий оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 – отсутствуют митохондрии, так как не определяются в поле зрения и/или разрушены и/или имеется только наружная мембрана, а содержимое разрушено у более чем 50% митохондрий клетки; 1 – митохондрии имеются, при этом крупные размеры у более чем 50% митохондрий, а кристы четко не дифференцируются у 25-49% митохондрий клетки, при этом матрикс электронно-плотный и/или определяются полиморфные кристы с расширенными промежутками между ними и/или кристы определяются в виде фрагментов в электронно-светлом матриксе у более 50%; 2 – митохондрии имеются, мелких размеров у более 50% митохондрий и кристы не дифференцируются у 25-49% митохондрий клетки, при этом матрикс электронно-плотный и/или определяются полиморфные кристы с расширенными промежутками между ними и/или кристы определяются в виде фрагментов в электронно-светлом матриксе; 3 – митохондрии имеются, обладают полиморфностью, где единичны случаи с нарушением мембраны и/или единичные случаи с разными формами крист и/или с электронно-темным матриксом без четкой дифференцировки крист и/или с электронно-светлым матриксом, где различимы целые и разрушенные кристы; 4 – митохондрии имеются мелких размеров более 50%, в которых кристы дифференцируются в более 75% матрикса; 5 – имеются митохондрии разных размеров, которые содержат целые кристы в более 75% матрикса;

- наличие и особенности расположения липидных включений оценивают от 0 до 5 баллов, где 0 – отсутствуют Лв; 1 – присутствуют Лв, располагаются группами и занимают более 79% цитоплазмы клетки; 2 – Лв присутствуют, располагаются группами и/или поодиночке и занимают 50-74% цитоплазмы клетки; 3 – присутствуют Лв,

располагаются группами и/или поодиночке и занимают 16-49% цитоплазмы клетки; 4 – присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают менее 5% цитоплазмы клетки; 5 – присутствуют Лв, располагаются группами и/или поодиночке и занимают 5-15% цитоплазмы клетки;

- 5 - взаимный контакт мембран митохондрий, агранулярной эндоплазматической сети и липидных включений (далее ВкМаЭПСЛв) оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 – отсутствует ВкМаЭПСЛв, так как митохондрии и/или аЭПС и/или липидные включения разрушены или не определяются в цитоплазме и/или разделены участками цитоплазмы разной электронной плотности друг от друга; 1 – присутствует ВкМаЭПСЛв, где до
- 10 30% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 2 – присутствует ВкМаЭПСЛв, где 31-60% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 3 – присутствует ВкМаЭПСЛв, где более 95% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий; 4 – присутствует ВкМаЭПСЛв, где 61-95% липидных включений контактируют с мембранами митохондрий;
- 15 затем оценивают функциональное состояние корковых эндокриноцитов надпочечников путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований данных клеток на электронограммах и устанавливают митоз – в случае, когда сумма баллов равна 1-8, гипофункцию – в случае, когда сумма баллов равна 9-23 балла, гиперфункцию – в
- 20 случае, когда сумма баллов равна 24-31 балла, нормальную функцию – в случае, когда сумма баллов равна 32-36 баллов.

25

30

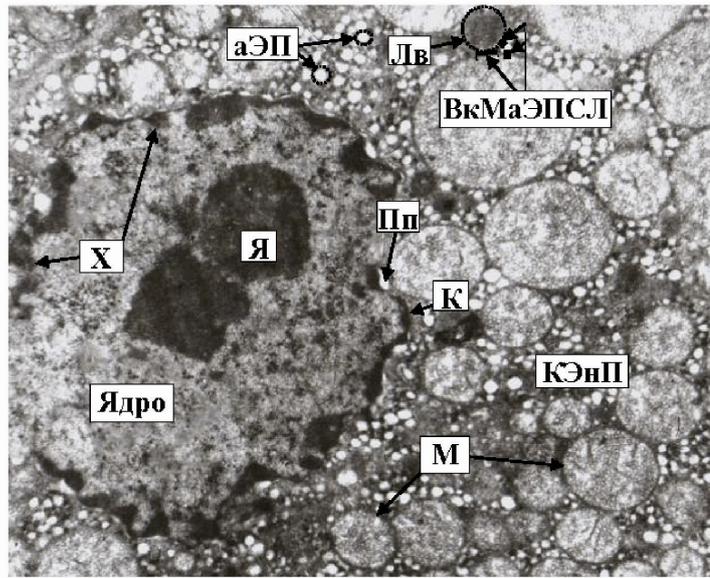
35

40

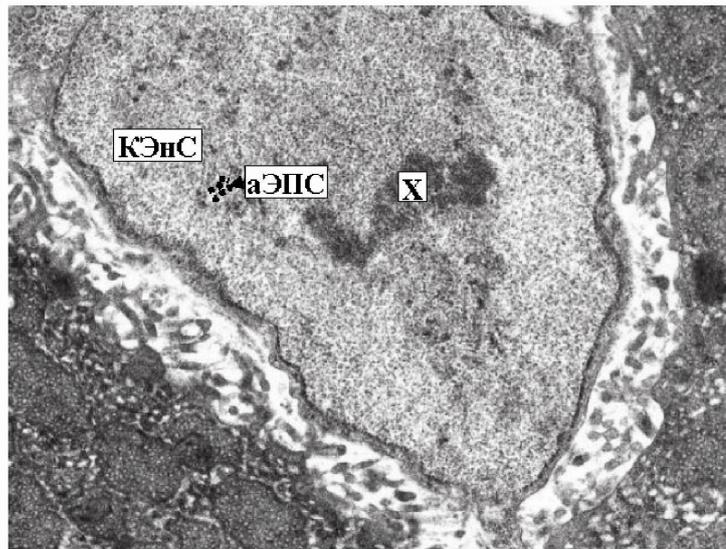
45

Зависимость функционального состояния коркового эндокриноцита от выявленных на электронограмме характеристик, входящих в него структурных образований					
№ п/п	Функциональное состояние коркового эндокриноцита (мин/макс в баллах)	Нормальная функция	Гипо-функция	Гипер-функция	Митоз
	Структурные образования коркового эндокриноцита (диапазон цифровых значений в баллах)				
1	ФЯ (0-2 балла)	2/2	1/2	1/2	0/0
2	К (0-4 баллов)	3/4	1/3	2/4	0/0
3	Пп (0-4 балла)	3/4	1/3	2/4	0/0
4	Я (0-2 балла)	1/2	0/1	1/2	0/0
5	Х (0-5 баллов)	5/5	2/3	4/4	1/1
6	аЭПС (0-5 баллов)	4/5	1/3	4/4	0/1
7	М (0-5 баллов)	5/5	1/3	3/4	0/5
8	Лв (0-5 баллов)	5/5	1/3	4/4	0/0
9	ВМаЭЛв (0-4 баллов)	4/4	1/2	3/3	0/1
Диапазон баллов:		32-36	9-23	24-31	1-8

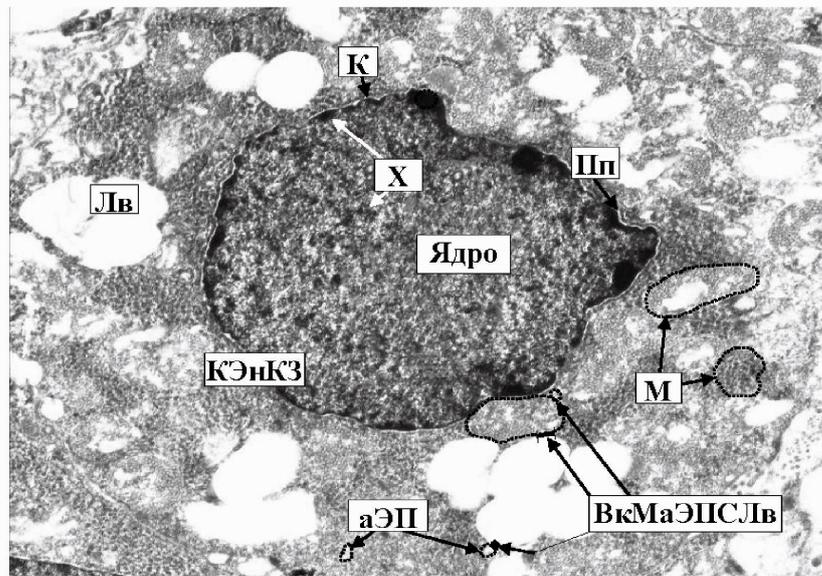
Фиг. 1



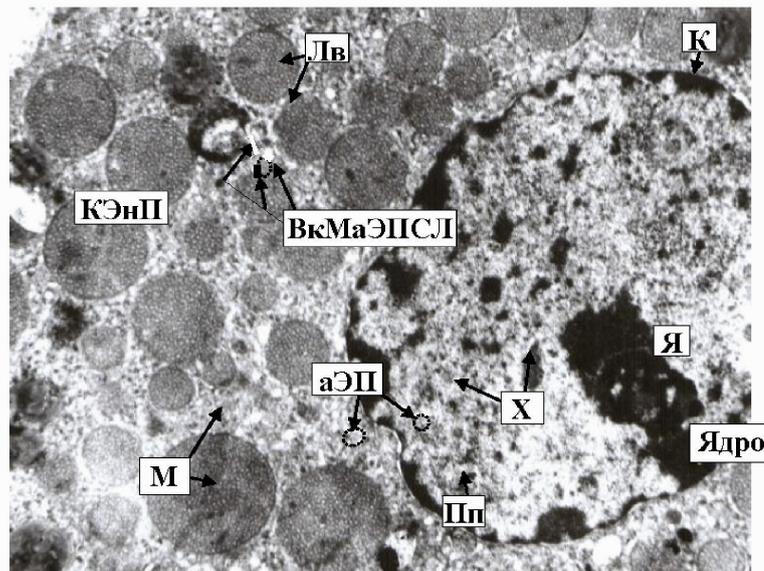
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5