



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/4833 (2023.08); G01N 2223/418 (2023.08); G01N 2800/046 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023111728, 05.05.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
05.05.2023Дата регистрации:  
05.12.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.05.2023

(45) Опубликовано: 05.12.2023 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Морозов Виталий Николаевич (RU),  
Лузин Владислав Игоревич (UA),  
Морозова Елена Николаевна (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: МОРОЗОВ В.Н. и др.Ультрамикроскопические особенности  
строения тироцитов щитовидной железы крыс  
после 60-дневной интоксикации бензоатом  
натрия // Вестник Волгоградского  
Государственного Медицинского  
Университета, июнь 2022, Т.19, N.1, стр.162-  
166. EA 016530 B1, 30.05.2012. RU 2442161 C2,  
10.02.2012. LAM J. et al. A Universal Approach  
to Analyzing (см. прод.)

## (54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТИРОЦИТОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Раскрыт способ оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы, который включает подготовку образцов тканей щитовидной железы с тироцитами, изготовление срезов, получение черно-белых снимков - электронограмм - путем трансмиссионно-электронной микроскопии. Причем для получения снимков выбирают не менее 10 клеток в поле зрения случайным выбором на срезе щитовидной железы на увеличении 8000. Морфологические характеристики структурных образований, таких как ядро, кариолема, перинуклеарное пространство, ядрышко, хроматин, гранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии и

плазмолемма на электронограммах, оценивают в баллах, причем наименьшее цифровое значение - 0 баллов, присваивают той морфологической характеристике, которая максимально изменяет морфологию типичной органеллы тироцита, а наибольшее цифровое значение в баллах присваивают той морфологической характеристике, которая по структуре полностью соответствует норме. Определяют сумму цифровых значений в баллах и оценивают функциональное состояние тироцита: митоз - в случае, когда сумма баллов равна 7-8, гиподифференциация - 9-20, гипердифференциация - 21-27, нормальная функция - 28-36 баллов. Изобретение обеспечивает возможность получения

однозначного вывода о функциональном состоянии тироцитов щитовидной железы. 4 ил., 3 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

**Transmission Electron Microscopy with ImageJ // Cells, 2021, V.10, pp.1-17.**

R U 2 8 0 8 9 0 0 C 1

R U 2 8 0 8 9 0 0 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/4833 (2023.08); G01N 2223/418 (2023.08); G01N 2800/046 (2023.08)*(21)(22) Application: **2023111728, 05.05.2023**(24) Effective date for property rights:  
**05.05.2023**Registration date:  
**05.12.2023**

Priority:

(22) Date of filing: **05.05.2023**(45) Date of publication: **05.12.2023** Bull. № 34

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Morozov Vitalii Nikolaevich (RU),  
Luzin Vladislav Igorevich (UA),  
Morozova Elena Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi  
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU  
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD OF ASSESSING THE FUNCTIONAL STATE OF THYROCYTES OF THYROID GLAND**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: following is disclosed: a method of assessing the functional state of thyrocytes of the thyroid gland, which includes preparing samples of thyroid tissue with thyrocytes, making sections, obtaining black and white photographs — electron diffraction patterns — by transmission electron microscopy. Moreover, to obtain images, at least 10 cells per field of view are randomly selected from a section of the thyroid gland at a magnification of 8,000. The morphological characteristics of structural formations, such as the nucleus, karyolemma, perinuclear space, nucleolus, chromatin, granular endoplasmic reticulum, mitochondria and plasmolemma on electron diffraction patterns, are assessed in points, and the lowest digital value — 0 points — is assigned

to the morphological characteristic that maximally changes the morphology of the typical organelles of the thyrocyte, and the highest numerical value in points is assigned to the morphological characteristic whose structure fully corresponds to the norm. The sum of digital values in points is determined and the functional state of the thyrocyte is assessed: it is mitosis if the sum of points is 7–8, it is hypofunction if the sum of points is 9–20, it is hyperfunction if the sum of points is 21–27, it is normal function if the sum of points is 28–36 points.

EFFECT: invention makes it possible to obtain an unambiguous conclusion about the functional state of thyrocytes of the thyroid gland.

1 cl, 4 dwg, 3 tbl, 3 ex

Изобретение относится к области медицины, ветеринарии и морфологии, и предназначено для оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы на электронограммах.

Электронная микроскопия - это метод исследования, в котором используется пучок электронов, сфокусированный электромагнитными линзами, для изображения биологического и небиологического материалов с разрешением, превышающим таковое в световой микроскопии. Образцы готовят с помощью ультрамикротомы, предварительно помещая в пластиковую смолу, а потом делают срезы с помощью микротомы со стеклянным или алмазным ножом. Затем биологические объекты подвергают дополнительному этапу обработки - окрашиванию. Обычно используется комбинация уранилацетата и цитрата свинца, что позволяет обеспечить контраст. Эти два вещества связываясь с разными структурами клетки, будут обеспечивать контраст, необходимый для верификации структур клетки и тканей. Затем исследование окрашенного образца проводят с помощью электронно-оптических элементов трансмиссионно-электронного микроскопа. Окончательное черно-белое изображение формируется на флуоресцентном экране, фотопленке или полупроводниковых детекторах, так как воздействие электронов вызывает излучение света (Tizro P, Choi C, Khanlou N. Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2019; 1897:417-424. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_33. PMID: 30539461).

Обычно морфологи, анализируя данные изображения, используют описательный и сравнительный метод подачи информации. Так, учитывая, что первый электронный микроскоп был создан в 1931 году физиком Эрнст Руска и инженером-электриком Макс Кноль из Берлинского университета (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, 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 кариоплазму, кариолемму, хроматин, ядрышко. Пристальное внимание всех исследователей всегда обращается на наличие активного и неактивного хроматина и его распределение в кариоплазме, что отражает синтетическую 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: 10.1007/978-1-4939-7318-7\_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 расположение гетерохроматина - периферия, 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).

- плазмолемма принимает участие в эндоцитозе и экзоцитозе (Delavoie F, Royer C, Gasman S, Vitale N, Chasserot-Golaz S. Transmission Electron Microscopy and Tomography on Plasma Membrane Sheets to Study Secretory Docking. *Methods Mol Biol.* 2021;2233:301-309. doi: 10.1007/978-1-0716-1044-2\_20. PMID: 33222143). Так, ряд исследователей утверждает, что наличие развитых межклеточных контактов прямо пропорционально функциональной активности эпителиальных клеток (Effect of low calcium diet on the

ultrastructure of the rat parathyroid gland /H. Chen, D. Hayakawa, Sh. Emura, Yu. Ozawa, H. Taguchi, R. Yano, Sh. Shoumura// *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 2001. V. 78(5). P. 153-160).

Доказана также прямая зависимость высоты микроворсинок и секреторных гранул на поверхности тироцитов и активности данных клеток (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).

- цитоплазма состоит из органелл, включений и гиалоплазмы. Следует отметить, что анализ литературы показал, что представительность органелл напрямую зависит от 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 - внутренние складки мембраны - 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 синтезе липидов, белков и в гомеостазе кальция (Schwarz, D.S.; Blower, M.D. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016, 73, 79-94). При нарушении синтеза, захвата и накопления белков в ее цистернах развивается явление, которое в литературе называется «стресс эндоплазматической сети» - визуально определяется как расширение цистерн с электронно-плотным содержимым разной формы. (Morishita Y., Kabil O., Young K. Z., Kellogg A. P., Chang A., Arvan P. Thyrocyte cell survival and adaptation to chronic endoplasmic reticulum stress due to misfolded thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 2020 April 2: 295(20). 6876-6887. doi: 10.1074/jbc.RA120.012656). При этом, при гиперфункции клетки это морфологически проявляется увеличением расстояния между мембранами эндоплазматической сети с электронно-светлым содержимым (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).

Следует также отметить, что в организме существуют разные виды клеток и тканей, которые имеют свои особенности. Так, в эндокриноцитах могут быть развиты гранулярная или агранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии (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), микроворсинки - 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). 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 (Kuropka 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 занимает щитовидная железа с ее клетками - тироцитами (Loevner LA. Imaging of the thyroid gland. *Semin Ultrasound CT MR.* 1996 Dec;17(6):539-62. doi: 10.1016/s0887-2171(96)90003-7. PMID: 9023867), которые принимают участие в регуляции общего обмена организма, синтезируя T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> (Cicatiello AG, Di Girolamo D and Dentice M (2018) Metabolic Effects of the Intracellular Regulation of Thyroid Hormone: Old Players, New Concepts. *Front. Endocrinol.* 2018.9:474. doi: 10.3389/fendo.2018.00474). Согласно литературным данным ультрамикроскопически типичные тироциты имеют до 12 вытянутых микроворсинок, расположенных только с апикальной стороны клетки. Латеральные участки плазмолеммы тироцитов образуют соединительный комплекс и десмосомы, нередко встречаются интердигитации. Клеточная мембрана, граничащая с капилляром образует складки, показывающие функциональное состояние клетки. В цитоплазме много цистерн гранулярной эндоплазматической сети - уплощенных и со щелевидным просветом. Митохондрии круглой, вытянутой или овальной формы, встречаются в разных участках цитоплазмы. Ядро тироцитов округлое, расположено в базальной части клетки. Ядрышко чаще смещено от центра ядра. Перинуклеарное пространство на большей своей протяженности не визуализируется. Содержание гетерохроматина разное, но его меньше, чем эухроматина. Секреторные гранулы, как и лизосомы могут выявляться в цитоплазме клетки, их количество варьирует (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).

Морфологические методы являются обязательными для комплексной оценки структурно-функциональных изменений щитовидной железы в целом, и тироцитов в частности (Serra C, Silveira L. Evaluation of structural and ultrastructural changes in thyroid and parathyroid glands after near infrared irradiation: study on an animal model. *PeerJ.* 2021 Aug 5;9:e11891. doi: 10.7717/peerj.11891. PMID: 34430082; PMCID: PMC8349517). Одним из уникальных методов визуализации и оценки структурных компонентов тироцитов является трансмиссионно-электронная микроскопия (Ultrastructure of the Thyroid Gland. *Arch Intern Med.* 1969;123(1):111. doi: 10.1001/archinte.1969.00300110113041). При этом количественные методики - это объективный способ оценки структурных особенностей клетки на ультрамикроскопическом уровне, в том числе и тироцитов щитовидной железы. Однако, следует отметить, что способы для количественного анализа внутриклеточных структур 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 ультраструктурных особенностей разных клеток, с учетом их структурно-функциональных особенностей.

В Российской Федерации 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, а общего назначения, то есть одна и та же методика используется для разных видов клеток. При этом, способа оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы 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 тироцитов щитовидной железы 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 тироцитов щитовидной железы на электронограммах, с помощью присвоения цифровых значений морфологическим характеристикам структурных образований тироцитов.

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 глютаральдегида, 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. А затем самостоятельно предположить 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 тироцитов 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 тироцитов.

Задачей настоящего изобретения является создание способа оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы на электронограммах с учетом характеристик структурных образований тироцитов.

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

- форму ядра (далее ФЯ) оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 - отсутствует; 1 - форму определить сложно, так как она неправильная; 2 - плоская; 3 - овальная; 4 - круглая;

- целостность и конфигурацию кариолеммы (далее К) от 0 до 5 баллов, где 0 - нарушена целостность; 1 - кариолемма целая, имеются более 2 впячиваний, составляющих более 1/2 диаметра ядра, и/или впячивания, составляющие более 1/3 диаметра ядра, разной формы на протяженности более 50%; 2 - кариолемма целая, имеются более 2 впячиваний, составляющих более 1/2 диаметра ядра, и/или впячивания, составляющие более 1/3 диаметра ядра, разной формы на протяженности 30-49%; 3 - кариолемма целая, имеются 1 - 2 глубоких впячивания и/или волнообразные контуры на протяженности  $\geq 50\%$ ; 4 - кариолемма целая, имеются волнообразные контуры на протяженности 10-49%; 5 - кариолемма целая, контуры ровные и/или волнообразные на протяжении 1-9%;

- 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%;

5 - наличие ядрышка и его структуру (далее Я) от 0 до 3 баллов, где 0 - отсутствует; 1 - имеется, однородной электронной плотности; 2 - имеется больше одного ядрышка ячеистой структуры; 3 - имеется одно ядрышко ячеистой структуры;

10 - наличие хроматина, а именно гетерохроматина и эухроматина (далее Х) в ядре от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствует, т.е. 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 - присутствует, но гетерохроматин занимает более 80% кариоплазмы; 3 - присутствует, но гетерохроматин занимает 50-79% кариоплазмы; 4 - присутствует, но гетерохроматин занимает менее 20% кариоплазмы; 5 - присутствует, но гетерохроматин занимает 20-49% кариоплазмы;

15 - наличие или отсутствие гранулярной эндоплазматической сети (далее гЭПС), с учетом просвета в ее цистернах, от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствует, т.е. мембранная органелла разрушена; 1 - присутствует, при этом цистерны растянуты и занимают более 60% содержимого цитоплазмы или содержат фибриллярные структуры или электронное плотное содержимое или фрагменты цистерн без просвета определяются в цитоплазме;

20 2 - присутствует, при этом цистерны растянуты с электронно-светлым содержимым и занимают 30-59% цитоплазмы; 3 - присутствует, при этом цистерны растянуты с электронно-светлым содержимым и занимают 10-29% цитоплазмы; 4 - присутствует, при этом цистерны имеют щелевидные просветы с электронно-светлым содержимым и расширенные участки в соотношении 1:1; 5 - присутствует, при этом цистерны имеют щелевидные просветы и извилистый ход, занимая более 30% цитоплазмы клетки;

25 - наличие, размеры и содержимое митохондрий (далее М) от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствуют, так как разрушены и/или имеется только наружная мембрана, а содержимое разрушено у более чем 50% митохондрий клетки; 1 - 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

30 определяют полиморфные кристы с расширенными промежутками между ними и/или кристы определяются в виде фрагментов в электронно-светлом матриксе у более 50%; 2 - 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 определяют полиморфные кристы с расширенными промежутками между ними и/или кристы определяются в виде фрагментов в электронно-светлом матриксе; 3 - 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 - имеются крупных и средних размеров митохондрии более 50%, в которых кристы дифференцируются в 25-75% матрикса; 5 - имеются митохондрии разных размеров, которые содержат целые кристы в более 75% матрикса;

40 - конфигурацию и целостность плазмолеммы (далее П) от 0 до 5 баллов, где 0 - плазмолемма клетки имеется, но прерывается; 1 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, не содержит межклеточные контакты и/или микроворсинки; 2 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит 1-5 межклеточных контакта и/или низкие, редко расположенные и/или измененной формы микроворсинки;

3 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит менее 30% поверхности мембраны с межклеточными контактами и/или низкие типичной конфигурации микроворсинки и/или полиморфные микроворсинки; 4 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит межклеточные контакты на 31-60% поверхности мембраны и/или средней величины микроворсинки; 5 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит более 60% поверхности мембраны с межклеточными контактами и/или типичные микроворсинки;

- далее определяют сумму в баллах цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам вышеуказанных структурных образований тироцита, и по таблице «Зависимость функционального состояния тироцита от выявленных на электронограмме характеристик входящих в него структурных образований», оценивают функциональное состояние тироцита: митоз - в случае, когда сумма баллов равна 7-8, гипофункция - 9-20, гиперфункция - 21-27, нормальная функция - 28-36 баллов. В указанной таблице диапазоны определены по характеристикам указанных выше структурных образований тироцита и распределены в зависимости от соответствия функционального состояния тироцита: 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, гранулярной эндоплазматической сети, митохондрий и плазмолеммы являются специфическими для разных функциональных состояний. Например, для хроматина при нормальной функции могут иметь место характеристики, соответствующие баллам 4 или 5, при гипофункции - 2 или 3 балла, при гиперфункции 4 балла, при митозе 1 балл. Следовательно, каждому функциональному состоянию тироцита 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 тироцитов щитовидной железы по сумме цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований тироцита.

Технический результат достигается путем заявленного способа, включающего подготовку образцов для исследования путем фиксации кусочков тканей с клетками в 2,5% раствора глютаральдегида, 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 тканей щитовидной железы с тироцитами,
- выбирают не менее 10 клеток в поле зрения случайным выбором на срезе щитовидной железы 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 тироцита, а наибольшее цифровое значение в баллах присваивают той морфологической характеристике, которая по структуре полностью соответствует норме;

5 - проводят оценку функциональной активности: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция тироцитов путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований данных клеток на электронограммах, при этом:

- форму ядра (далее ФЯ) оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 - отсутствует; 1 - форму определить сложно, так как она неправильная; 2 - плоская; 3 - овальная; 4 - круглая;

10 - целостность и конфигурацию кариолеммы (далее К) от 0 до 5 баллов, где 0 - нарушена целостность; 1 - кариолемма целая, имеются более 2 впячиваний, составляющих более 1/2 диаметра ядра, и/или впячивания, составляющие более 1/3 диаметра ядра, разной формы на протяженности более 50%; 2 - кариолемма целая, имеются более 2 впячиваний, составляющих более 1/2 диаметра ядра, и/или впячивания, составляющие более 1/3 диаметра ядра, разной формы на протяженности 30-49%; 3 - кариолемма целая, имеются 1 - 2 глубоких впячивания и/или волнообразные контуры на протяженности более 50%; 4 - кариолемма целая, имеются волнообразные контуры на протяженности 10-49%; 5 - кариолемма целая, контуры ровные и/или волнообразные на протяжении 1-9%;

20 - 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 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%;

30 - наличие ядрышка и его структуру (далее Я) от 0 до 3 баллов, где 0 - отсутствует; 1 - имеется, однородной электронной плотности; 2 - имеется больше одного ядрышка ячеистой структуры; 3 - имеется одно ядрышко ячеистой структуры;

- наличие хроматина, а именно гетерохроматина и эухроматина (далее Х) в ядре от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствует, т.е. 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 - присутствует, но гетерохроматин занимает более 80% кариоплазмы; 3 - присутствует, но гетерохроматин занимает 50-79% кариоплазмы; 4 - присутствует, но гетерохроматин занимает менее 20% кариоплазмы; 5 - присутствует, но гетерохроматин занимает 20-49% кариоплазмы;

40 - наличие или отсутствие гранулярной эндоплазматической сети (далее гЭПС), с учетом просвета в ее цистернах от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствует, т.е. мембранная органелла разрушена; 1 - присутствует, при этом цистерны растянуты и занимают более 60% содержимого цитоплазмы или содержат фибриллярные структуры или электронное плотное содержимое или фрагменты цистерн без просвета определяются в цитоплазме; 2 - присутствует, при этом цистерны растянуты с электронно-светлым содержимым и занимают 30-59% цитоплазмы; 3 - присутствует, при этом цистерны растянуты с электронно-светлым содержимым и занимают 10-29% цитоплазмы; 4 - присутствует,

при этом цистерны имеют щелевидные просветы с электронно-светлым содержимым и расширенные участки в соотношении 1:1; 5 - присутствует, при этом цистерны имеют щелевидные просветы и извилистый ход, занимая более 30% цитоплазмы клетки;

- наличие, размеры и содержимое митохондрий (далее М) от 0 до 5 баллов, где 0 - отсутствуют, так как разрушены и/или имеется только наружная мембрана, а содержимое разрушено у более 50% митохондрий клетки; 1 - имеются, крупные размеры у более 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 - имеются, мелких размеров у более 50% митохондрий, а кристы не дифференцируются у более 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, 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 крупных и средних размеров митохондрии более 50%, в которых кристы дифференцируются в 25-75% матрикса; 5 - имеются митохондрии разных размеров, которые содержат целые кристы в более 75% матрикса;

- конфигурацию и целостность плазмолеммы (далее П) от 0 до 5 баллов, где 0 - плазмолемма клетки имеется, но прерывается; 1 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, не содержит межклеточные контакты и/или микроворсинки; 2 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит 1-5 межклеточных контакта и/или низкие, редко расположенные и/или измененной формы микроворсинки; 3 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит менее 30% поверхности мембраны с межклеточными контактами и/или низкие типичной конфигурации микроворсинки и/или полиморфные микроворсинки; 4 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит межклеточные контакты на 31-60% поверхности мембраны и/или средней величины микроворсинки; 5 - плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит более 60% поверхности мембраны с межклеточными контактами и/или типичные микроворсинки;

- далее определяют сумму цифровых значений в баллах, присвоенных морфологическим характеристикам вышеуказанных структурных образований тироцита, и по таблице «Зависимость функционального состояния тироцита от выявленных на электронограмме характеристик входящих в него структурных образований» (Фиг.1), оценивают функциональное состояние тироцита: митоз - в случае, когда сумма баллов равна 7-8, гипофункция - 9-20, гиперфункция - 21-27, нормальная функция - 28-36 баллов.

Изобретение характеризуется следующими фигурами:

Фиг. 1. Таблица «Зависимость функционального состояния тироцита от выявленных на электронограмме характеристик входящих в него структурных образований», с указанием диапазона присвоенных цифровых значений в баллах для каждого структурного образования тироцита 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, гранулярной эндоплазматической сети, митохондрий и плазмолеммы, где: мин - минимальное значение в баллах, макс -

максимальное значение в баллах для данного состояния тироцита.

Фиг. 2. Электронограмма по примеру 1 участка щитовидной железы от крысы 2, где Т - тироцит, Х - гетерохроматин, гЭПС - гранулярная эндоплазматическая сеть, М - митохондрии, Мв - микроворсинка, К - кариолема, П - плазмолемма, Пп - перинуклеарное пространство, В - волокнистые структуры в полостях гЭПС. Увеличение × 8000.

Фиг. 3. Электронограмма по примеру 2 участка щитовидной железы от крысы 14: Т - тироцит, Х - гетерохроматин, гЭПС - гранулярная эндоплазматическая сеть, М - митохондрии, Мв - микроворсинка, Я - ядрышко, К - кариолема, П - плазмолемма. Увеличение × 8000.

Фиг. 4. Электронограмма по примеру 3 участка щитовидной железы от крысы 10: Т - тироцит, Х - хромосомы, расположенные в виде двух электронно-плотных скоплений, гЭПС - гранулярная эндоплазматическая сеть, М - митохондрии, П - плазмолемма. Увеличение × 8000.

Способ осуществляют следующим образом:

Для осуществления предложенного способа оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы на электронограммах был проведен анализ электронограмм тироцита щитовидной железы 30 половозрелых крыс-самцов массой 200-210 грамм, полученных из вивария ГУ «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки». В ходе проведения эксперимента животные были разделены на 5 групп по 6 особей в каждой группе. Каждую группу животных размещали в отдельных клетках, предварительно присвоив номер каждому животному от 1 до 30. Затем каждую клетку, в которой располагалось по 6 крыс из одной группы, также кодировали, присваивая буквенное значение Х и номер, соответствующий вводимому веществу. Первой и второй группе по 6 особей в каждой ежедневно в течение 60-ти дней при помощи желудочного зонда вводился 1 мл раствора бензоата натрия в дозировке 500 мг/кг и 1000 мг/кг массы тела соответственно. Указанные дозы бензоата натрия являются одной и двумя суточными предельно допустимыми концентрациями для крыс. При их расчете за основу были взяты суточная предельно допустимая 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). Третьей и четвертой группам в аналогичных условиях и сроках как в 1-й и 2-й группах - вводили бензоата натрия в дозе 500 мг/кг и 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 (Шулькин А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики. Фарматека. 2016; s4: 65-71). Пятой группе с 6 животными в аналогичных условиях 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 2, выбранной случайным образом из клетки с шестью животными, маркированной кодом X2, после выведения из эксперимента на третьи сутки наблюдения, извлекли щитовидную железу и измельчили ее на кусочки. Подготовку к эксперименту проводили путем фиксации кусочков щитовидной железы 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, после этого обезвоженные образцы помещали в смесь «Эпон-аралдит» и выдерживали в термостате при 60°C 36 часов. Затем 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 случайным выбором на срезе щитовидной железы на увеличении 8000 и фотографировали с получением электронограммы.

Затем проводили оценку функциональной активности: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция тироцитов путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований данных клеток на электронограмме (Фиг. 2) для анализа функционального состояния клетки под влиянием препарата X2. Структурным образованиям в тироците, а именно ядру, кариолемме, перинуклеарному пространству, ядрышку, хроматину, гранулярной эндоплазматической сети, митохондриям и плазмолемме на электронограмме, присваивали баллы согласно заявленному способу, которые вносили в таблицу 1 «Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований тироцита», с целью определения их функционального состояния» для получения суммы цифровых значений.

Таблица 1

«Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований тироцита»

№ п/п	Структурные образования тироцита (диапазон цифровых значений в баллах)	баллы					
		0	1	2	3	4	5
1	ФЯ (0-4 балла)				+		
2	К (0-5 баллов)				+		
3	Пп (0-4 балла)			+			
4	Я (0-3 балла)	+					
5	Х (0-5 баллов)				+		
6	гЭПС (0-5 баллов)		+				
7	П (0-5 баллов)				+		
8	М (0-5 баллов)				+		
Сумма:		0	1	2	15		
<b>ВСЕГО:</b>		<b>18 баллов</b>					

В результате было получено 18 баллов, что согласно таблице «Зависимость

функционального состояния тироцита от выявленных на электронограмме характеристик входящих в него структурных образований» на фиг.1 входит в диапазон 9-20, что соответствует функциональному состоянию тироцита - гипофункция. Затем после расшифровки закодированных обозначений, выявили, что крыса 2 относилась к группе животных, которым вводили вещество X2 - бензоат натрия в дозе 1000 мг/кг массы тела, в течении 60 суток, что вызвало согласно результатам способа оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы на третьи сутки наблюдения гипофункцию тироцита щитовидной железы крысы 2.

#### Пример 2.

У крысы 14, взятой из другой клетки, тироциты для исследования готовили как в примере 1. Проводили оценку функциональной активности: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция тироцитов путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований данных клеток на электронограммах для анализа функционального состояния клетки под влиянием препарата X3. Структурным образованиям в тироците, а именно ядру, кариолемме, перинуклеарному пространству, ядрышку, хроматину, гранулярной эндоплазматической сети, митохондриям и плазмолемме на электронограмме (фиг. 3), присваивали баллы согласно заявленному способу, которые вносили в Таблицу 2 «Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований тироцита», с целью определения их функционального состояния» для получения суммы цифровых значений.

#### Таблица 2.

«Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований тироцита.

№ п/п	Структурные образования тироцита (диапазон цифровых значений в баллах)	баллы					
		0	1	2	3	4	5
1	ФЯ (0-4 балла)				+		
2	К (0-5 баллов)						+
3	Пп (0-4 балла)						+
4	Я (0-3 балла)		+				
5	Х (0-5 баллов)					+	
6	гЭПС (0-5 баллов)						+
7	П (0-5 баллов)						+
8	М (0-5 баллов)						+
Сумма:			1		3	4	25
<b>ВСЕГО:</b>		<b>33 балла</b>					

В результате было получено 33 балла, что согласно таблице «Зависимость функционального состояния тироцита от выявленных на электронограмме характеристик входящих в него структурных образований» на фиг.1 входит в диапазон 28-36, что соответствует нормальному функциональному состоянию тироцита. Затем после расшифровки закодированных обозначений, выявили, что крыса 14 относилась к группе животных, которым вводили вещество X3 - 1 мл 0,9% изотонического раствора

натрия хлорида в течении 60 суток, что проявилось согласно результатам способа оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы на электронограмме в виде нормальной функции тироцита щитовидной железы крысы 14 на третьи сутки наблюдения.

5 Пример 3.

У крысы 10, взятой из очередной клетки отличной от примера 1 и 2, тироциты для исследования готовили как в примере 1. Проводили оценку функциональной активности: митоз или гиперфункция или гипофункция или нормальная функция тироцитов путем вычисления суммы цифровых значений, присвоенных морфологическим характеристикам структурных образований данных клеток на электронограммах для анализа функционального состояния клетки под влиянием препарата X1. Структурным образованиям в тироците, а именно ядру, кариолемме, перинуклеарному пространству, ядрышку, хроматину, гранулярной эндоплазматической сети, митохондриям и плазмолемме на электронограмме (фиг. 4), присваивали баллы согласно заявленной методике, которые вносили в Таблицу 3 «Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований тироцита», с целью определения их функционального состояния» для получения суммы цифровых значений.

Таблица 3.

«Расчет суммы цифровых значений, присвоенных разным характеристикам структурных образований тироцита.

№ п/п	Структурные образования тироцита (диапазон цифровых значений в баллах)	баллы					
		0	1	2	3	4	5
1	ФЯ (0-4 балла)	+					
2	К (0-5 баллов)	+					
3	Пп (0-4 балла)	+					
4	Я (0-3 балла)	+					
5	Х (0-5 баллов)		+				
6	гЭПС (0-5 баллов)		+				
7	П (0-5 баллов)		+				
8	М (0-5 баллов)						+
Сумма:		0	3				5
<b>ВСЕГО:</b>		<b>8 баллов</b>					

В результате было получено 8 баллов, что согласно таблице «Зависимость функционального состояния тироцита от выявленных на электронограмме характеристик входящих в него структурных образований» на фиг.1 входит в диапазон 7-8, что соответствует функциональному состоянию тироцита - митоз. Затем после расшифровки, выявлено, что крыса 10 относилась к группе животных, которым вводили вещество X1 - бензоат натрия в дозе 500 мг/кг массы тела совместно с мексидолом в дозе 50 мкг/кг массы тела в течении 60 суток, что проявилось согласно результатам способа оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы на электронограмме в виде митоза, выявленного в тироците щитовидной железы крысы 10 на третьи сутки наблюдения.

Установлено, что воздействие данных препаратов не вызывает гиперфункцию в тироцитах щитовидной железы.



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

Применение данного способа позволит как начинающим так и опытным исследователям легко, быстро, объективно оценить функциональное состояние тироцитов щитовидной железы 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 тироцитах в эксперименте.

#### (57) Формула изобретения

Способ оценки функционального состояния тироцитов щитовидной железы на электронограммах, включающий подготовку образцов, изготовление срезов, получение черно-белых снимков – электронограмм - путем трансмиссионно-электронной микроскопии, отличающийся тем, что для исследования готовят кусочки тканей щитовидной железы с тироцитами, выбирают не менее 10 клеток в поле зрения случайным выбором на срезе щитовидной железы на увеличении 8000 и фотографируют с получением электронограмм; морфологические характеристики структурных образований, таких как ядро, кариолема, перинуклеарное пространство, ядрышко, хроматин, гранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии и плазмолемма на электронограммах, оценивают в баллах, причем наименьшее цифровое значение – 0 баллов присваивают той морфологической характеристике, которая максимально изменяет морфологию типичной органеллы тироцита, а наибольшее цифровое значение в баллах присваивают той морфологической характеристике, которая по структуре полностью соответствует норме, при этом:

- форму ядра (далее ФЯ) оценивают от 0 до 4 баллов, где 0 – отсутствует; 1 – форму определить сложно, так как она неправильная; 2 – плоская; 3 – овальная; 4 – круглая;

- целостность и конфигурацию кариолеммы (далее К) от 0 до 5 баллов, где 0 – нарушена целостность; 1 – кариолема целая, имеются более 2 впячиваний, составляющих более 1/2 диаметра ядра, и/или впячивания, составляющие более 1/3 диаметра ядра, разной формы на протяженности более 50%; 2 – кариолема целая, имеются более 2 впячиваний, составляющих более 1/2 диаметра ядра, и/или впячивания, составляющие более 1/3 диаметра ядра, разной формы на протяженности 30-49%; 3 – кариолема целая, имеются 1-2 глубоких впячивания и/или волнообразные контуры на протяженности более 50%; 4 – кариолема целая, имеются волнообразные контуры на протяженности 10-49%; 5 – кариолема целая, контуры ровные и/или волнообразные на протяжении 1-9%;

- 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 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%;

5 - наличие ядрышка и его структуру (далее Я) от 0 до 3 баллов, где 0 – отсутствует; 1 – имеется, однородной электронной плотности; 2 – имеется больше одного ядрышка ячеистой структуры; 3 – имеется одно ядрышко ячеистой структуры;

10 - наличие хроматина, а именно гетерохроматина и эухроматина (далее Х) в ядре от 0 до 5 баллов, где 0 – отсутствует, т.е. 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 – присутствует, но гетерохроматин занимает более 80% кариоплазмы; 3 – присутствует, но гетерохроматин занимает 50-79% кариоплазмы; 4 – присутствует, но гетерохроматин занимает менее 20% кариоплазмы; 5 – присутствует, но гетерохроматин занимает 20-49% кариоплазмы;

15 - наличие или отсутствие гранулярной эндоплазматической сети (далее гЭПС), с учетом просвета в ее цистернах от 0 до 5 баллов, где 0 – отсутствует, т.е. мембранная органелла разрушена; 1 – присутствует, при этом цистерны растянуты и занимают более 60% содержимого цитоплазмы или содержат фибриллярные структуры или электронное плотное содержимое или фрагменты цистерн без просвета определяются  
20 в цитоплазме; 2 – присутствует, при этом цистерны растянуты с электронно-светлым содержимым и занимают 30-59% цитоплазмы; 3 – присутствует, при этом цистерны растянуты с электронно-светлым содержимым и занимают 10-29% цитоплазмы; 4 – присутствует, при этом цистерны имеют щелевидные просветы с электронно-светлым содержимым и расширенные участки в соотношении 1:1; 5 – присутствует, при этом  
25 цистерны имеют щелевидные просветы и извилистый ход, занимая более 30% цитоплазмы клетки;

- наличие, размеры и содержимое митохондрий (далее М) от 0 до 5 баллов, где 0 – отсутствуют, так как разрушены и/или имеется только наружная мембрана, а содержимое разрушено у более 50% митохондрий клетки; 1 – имеются, крупные размеры  
30 у более 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 – имеются, мелких размеров у более 50% митохондрий, а кристы не дифференцируются у более 25-49% митохондрий  
35 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, 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  
40 крист и/или с электронно-светлым матриксом, где различимы целые и разрушенные кристы; 4 – имеются крупных и средних размеров митохондрии более 50%, в которых кристы дифференцируются в 25-75% матрикса; 5 – имеются митохондрии разных размеров, которые содержат целые кристы в более 75% матрикса;

45 - конфигурацию и целостность плазмолеммы (далее П) от 0 до 5 баллов, где 0 – плазмолемма клетки имеется, но прерывается; 1 – плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, не содержит межклеточные контакты и/или микроворсинки; 2 – плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит 1-5 межклеточных контакта и/или низкие редко расположенные и/или измененной формы микроворсинки;

3 – плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит менее 30% поверхности мембраны с межклеточными контактами и/или низкие типичной конфигурации микроворсинки и/или полиморфные микроворсинки; 4 – плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит межклеточные контакты на 31-  
5 60% поверхности мембраны и/или средней величины микроворсинки; 5 – плазмолемма клетки имеется, целая на всем протяжении, содержит более 60% поверхности мембраны с межклеточными контактами и/или типичные микроворсинки; далее определяют сумму цифровых значений в баллах и оценивают функциональное состояние тироцита: митоз – в случае, когда сумма баллов равна 7-8, гиподисфункция – 9-20, гипердисфункция – 21-27,  
10 нормальная функция – 28-36 баллов.

15

20

25

30

35

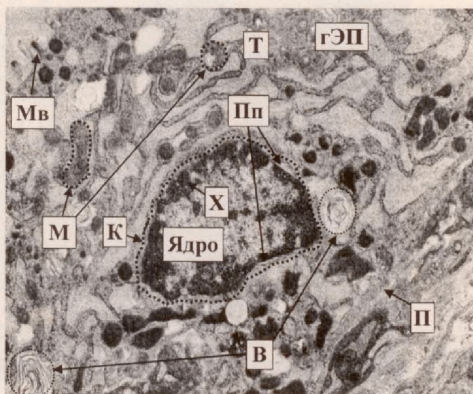
40

45

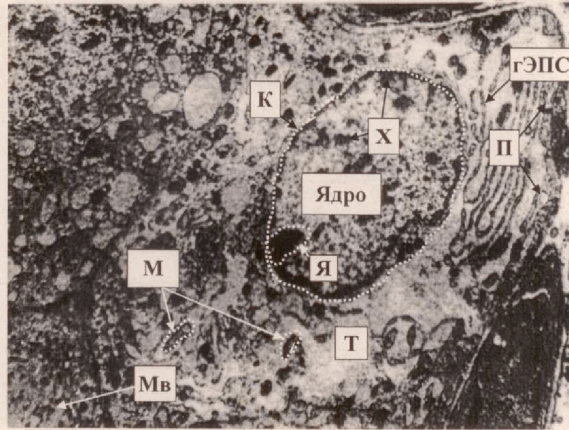
**Зависимость функционального состояния тироцита от выявленных на электронограмме характеристик входящих в него структурных образований**

№ п/п	Функциональное состояние тироцита (мин/макс в баллах)	Нормальная функция	Гипо-функция	Гипер-функция	Митоз
	Структуры тироцита (диапазон цифровых значений в баллах)				
1	ФЯ (0-4 балла)	3/4	1/2	3/3	0/0
2	К (0-5 баллов)	4/5	1/3	3/4	0/0
3	Пп (0-4 балла)	3/4	1/2	2/3	0/0
4	Я (0-3 балла)	2/3	0/1	2/3	0/0
5	Х (0-5 баллов)	4/5	2/3	4/4	1/1
6	гЭПС (0-5 баллов)	4/5	1/3	2/3	1/1
7	П (0-5 баллов)	4/5	2/3	2/3	1/1
8	М (0-5 баллов)	4/5	1/3	3/4	4/5
<b>Диапазон баллов:</b>		<b>28-36</b>	<b>9-20</b>	<b>21-27</b>	<b>7-8</b>

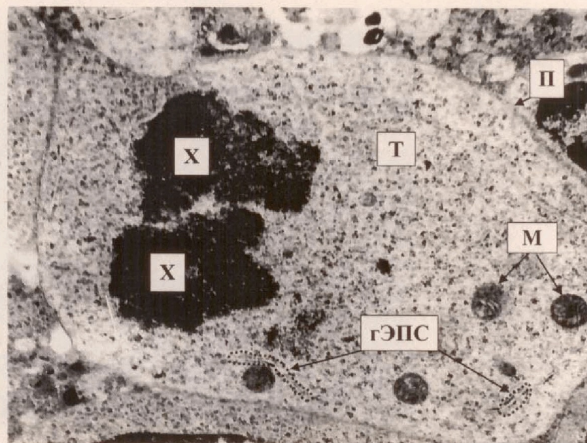
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4