УКРАЇНА

(19) **(UA)**

(11) **13258**

(51) МПК (2006)
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

Деклараційний патент
на корисну модель

видано відповідно до Закону України
"Про охорону прав на винаходи і корисні моделі"

Голова Державного департаменту інтелектуальної власності **М. Паладій**

(21) u 2005 09734
(22) 17.10.2005
(24) 15.03.2006
(46) 15.03.2006. Бюл.№ 3

(72) Кайдашев Ігор Петрович, Ліхачов Володимир Костянтинович, Матьоха Тетяна Вікторівна, Шинкевич Вікторія Ігорівна
(73) Кайдашев Ігор Петрович, Ліхачов Володимир Костянтинович, Матьоха Тетяна Вікторівна, Шинкевич Вікторія Ігорівна

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ МАТКИ

УКРАЇНА

(19) UA (11) 13258 (13) U

(51) МПК (2006)
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під відповідальність власника патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ МАТКИ

(21) u200509734
(22) 17.10.2005
(24) 15.03.2006
(46) 15.03.2006, Бюл. № 3, 2006 р.
(72) Кайдашев Ігор Петрович, Ліхачов Володимир Костянтинович, Матьоха Тетяна Вікторівна, Шинкевич Вікторія Ігорівна
(73) Кайдашев Ігор Петрович, Ліхачов Володимир Костянтинович, Матьоха Тетяна Вікторівна, Шинкевич Вікторія Ігорівна
(57) Спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки матки, що включає відбір матеріалу, приготування та фіксацію препаратів, виснаження ендогенної пероксидази, обробку препаратів антитілами до маркерів імунокомпетентних клітин, їх візуалізацію та оцінку, який **відрізняється** тим, що відбір матеріалу виконують шляхом біопсії ендометрію, препарати виготовляють на кріостаті, виснаження ендогенної пероксидази проводять 0,3 % розчином перекису водню, як антитіла використовують моноклональні антитіла до CD3, CD4, CD8 та додатково CD20 та HLA-DR-клітин, а оцінку проводять шляхом з'ясування взаєморозташування імуноцитів та підрахунком їх числа відносно епітеліоцитів.

1

Запропонована корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до гінекології.

Дослідження функціонального стану слизової оболонки матки обумовлено тим, що в останні роки в Україні відмічено значний ріст гінекологічної патології, причому провідна роль належить запальним захворюванням жіночих статевих органів. Своєчасна діагностика дозволяє обрати адекватну терапію і захистити організм від подальших проблем. Відомі способи оцінки функціонального стану слизової оболонки: визначення рівня sIgA в цервікальному слизу [Алешкин В.А., Макаров О.В., Шайков К.А. Состояние местного иммунитета при воспалительных заболеваниях женских половых органов и влияние на него иммуномодулятора кипферона. - М.: 2000. - Иммунология. - № 5. - С. 41-44]; цитологічне дослідження клітин шийки матки [Хмельницький О.К., Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки. - СПб. - "SOTIS". - 2000. - С. 19-58]; імуногістохімічний метод визначення рецепторів естрогену та прогестерону в тканинних зрізах [Thomton J.G., Wells M. Oestrogen receptor in glands and stroma of normal and neoplastic human endometrium; a combined immunohistohemical and morphometric study. J Clin Pathol 1987; 40: p. 42-1437]; визначення активності ферментів в вагінальних виділеннях при цервікальній інтраепітеліальній неоплазії [Терихова Н.А., Петрович Ю.А., Манухин Й.Б. Энзимология и неинвазивная диагностика

2

ностика герпесной и папилломавирусной инфекции. - М: Клин. лабор. диагностика. - 2001. - № 11. - С. 10.].

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки, що включає відбір матеріалу (слиз з цервікального каналу, накопичений за 18 годин в ковпачку Кафка), приготування препаратів на знежирених предметних скельцях та їх фіксація у 100% ацетоні з послідуючим промиванням фосфатно-забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) з pH 7,3, виснаження ендогенної пероксидази 10% розчином перекису водню в метанолі, обробку препаратів антитілами до маркерів імунокомпетентних клітин, їх візуалізацію та оцінку дослідження показників місцевого імунітету шляхом визначення $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, LFA-1 і IL-$2R^+$-лімфоцитів в цервікальному слизу імуногістохімічним методом з використанням мишачих моноклональних антитіл до відповідних маркерів лімфоцитів людини ("Boehringer Mannheim") [Дергачова Т.И., Шурлыгина А.В., Юкляева Н.В., Литвиненко Г.И., Єфремов А.В., Труфакин В.А. Влияние различных способов местной терапии на субпопуляционный состав лимфоцитов слизи цервикального канала у женщин с острыми воспалительными заболеваниями матки и придатков // Иммунология. - 1998. - № 5 - С. 53-55].

На мазок наносять мишачі моноклональні антитіла до CD3, CD4, CD8, LFA-1, IL-2R-антигенів

(19) UA (11) 13258 (13) U

людини, інкубують 1 годину. Ділянки зв'язування моноклональних антитіл з відповідними антигенами лімфоцитів виявляли за допомогою овідин-біотинового набору (Extra-2 Mouse ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit, "Sigma"), міченого пероксидазою хріну. Пероксидазу виявляли за допомогою 0,025% розчину діамінобензидину ("Sigma") в 0,03% розчині перекису водню в ЗФР. Ядра клітин дофарбовували 1% розчином малахітового зеленого в дистильованій воді. Відсотковий вміст лімфоцитів, що дали позитивну реакцію на пероксидазу, підраховували під світовим мікроскопом при збільшенні 7×90 під масляною імерсією.

Однак відомий спосіб має низку недоліків, які знижують ступінь його ефективності, а саме:

1. Лімфоцити цервікального слизу дають недостатнє уявлення про стан внутрішньоепітеліальних лімфоцитів - основних представників імунологічного апарату тканини шийки матки, бо потрапляючи в порожнину цервікального каналу, вони тривалий час (18 годин) знаходяться під впливом патогенної мікрофлори, ферментів, що призводить до зміни антигенних детермінант імуноцитів.

2. Недостатня інформативність щодо розташування імунокомпетентних клітин в шарах шийкового епітелію, внаслідок відсутності гістологічного контролю, а також передбачає досить ускладнену оцінку кількості імунокомпетентних клітин у слизу.

3. Запропонований для виснаження ендогенної пероксидази висококонцентрований 10% розчин перекису водню призводить до руйнування антигенної детермінанти вивчаємих клітин.

4. Не взято до уваги визначення $CD20^+$, $HLA-DR^+$-клітин, що разом з $CD4^+$, $CD8^+$ являються основними представниками імунологічного апарату слизових оболонок [Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергологія. - Одеса: "Астро-Принт" - 1999. - 603с.].

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки матки, шляхом удосконалення відомого, за допомогою визначення кількості та розташування в тканині основних імунокомпетентних клітин (Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, дендритних клітин), досягти підвищення інформативності та забезпечити підвищення ступеню його ефективності.

Поставлену задачу вирішують створенням способу оцінки функціонального стану слизової оболонки матки, що включає відбір матеріалу, приготування та фіксацію препаратів, виснаження ендогенної пероксидази, обробку препаратів антитілами до маркерів імунокомпетентних клітин, їх візуалізацію та оцінку, який, згідно винаходу, відрізняється тим, що відбір матеріалу виконують шляхом біопсії ендометрію, препарати виготовляють на кріостаті, виснаження ендогенної пероксидази проводять 0,3% розчином перекису водню, як антитіло використовують моноклональні антитіла до CD3, CD4, CD8 та додатково CD20, HLA-DR-клітин а оцінку проводять шляхом з'ясування взаєморозташування імуноцитів та підрахунком їх числа по відношенню до епітеліоцитів (на 100 епітеліоцитів).

Спосіб оцінки здійснюють наступним чином:

1. Матеріал для дослідження одержують шляхом біопсії ендометрію (кюреткою № 1 по передній стінці матки), транспортують в фізіологічному розчині (20-30 хвилин після забору), занурюють в карбоксиметил-целюлозі та заморожують в рідкому азоті. З біоптатів виготовляють на кріостаті зрізи 5-7мкм, наносять на адгезивні скельця, висушують і фіксують в льодяному ацетоні.

2. Виснажують ендогенну пероксидазу 0,3% розчином перекису водню 10 хвилин.

3. Зрізи обробляють первинними моноклональними антитіла до мембраних маркерів імуноцитів: CD3, CD4, CD8, CD20, HLA-DR, інкубують 1 годину при t+37°C.

4. Тричі по 5 хв. промивають скельця забуференим фізрочином (ЗФР).

5. Наносять на зрізи вторинні антитіла - козячі антитіла до мишачих імуноглобулінів, мічені пероксидазою хріна ("Сорбент", Росія) (ПАП-комплексом), або кон'юговані з біотином (Nova Castra, United Kingdom), інкубують 1 год. при t+37°C і знову відмивають ЗФР.

6. Наносять третичні антитіла ExtraAvidinperoxydase кон'югат (Nova Castra, United Kingdom), інкубують 30 хв., відмивають у ЗФР.

7. Візуалізують реакцію антиген-антитіло за допомогою проявочної суміші з аміноетілкарбазоном, або диамінобензидином, яку готують ex tempore, наносять на зрізи на 10 хв., а потім змивають, зануривши в дистильовану воду.

8. Проводиться дозабарвлення препаратів гематоксиліном Майора, що дозволяє оцінити співвідношення виявлених імуноцитів до гістологічної будови слизової оболонки.

9. Ідентифікують клітини, що позитивно прореагували, оцінюють їх кількість, локалізацію, солокалізацію і особливості будови, інші характеристики.

Приклад 1.

Дослідження проводилося для слизової оболонки матки (ендометрію) у клінічно здорових жінок, інфікованих збудниками ІПСШ (хламідії, мікоплазми, уреаплазми, ВПГ II типу), за допомогою непрямого біотин-екстравідин-пероксидазного методу. В якості первинних антитіл використовували моноклональні мишачі антитіла до CD3, CD4, CD8, CD20, HLA-DR. Друга реакція полягала у зв'язуванні первинних моноклональних антитіл антитілами, міченими біотином. Екстравідин використовувався у якості третього шару і виявляв біотинильовану мітку. Візуалізація реакції проводилася за допомогою діамінобензидину солянокислого. Отримані результати виявили значну активацію всіх ланок (антигенпрезентуючої, індукторної та ефекторної) місцевого клітинного імунітету.

Приклад 2.

Проведено дослідження слизової оболонки матки у жінок-носіїв ВМК через 3 місяці використання непрямим імуноферментним методом. В якості первинних моноклональних антитіл використовували моноклональні мишачі антитіла. Другим шаром служили антитіла кози до IgG миші, мічені пероксидазою хріна (anti IgG-HRP). Візуалізацію проводили за допомогою 3-аміно-9-етилкарбазола

(Nova Castra, United Kingdom). Продукт реакції мав червоне забарвлення. Виявлено активацію антигенпрезентуючої (HLA-DR) та регуляторно-хелперної (CD4) ланок місцевого клітинного імунітету.

Приклад 3.

Досліджували біоптат ендометрію у жінок-носіїв ВМК, інфікованих збудниками ІПСШ, без клінічних проявів запального процесу за допомогою пероксидаза-антипероксидазного методу. В якості первинних моноклональних антитіл використовували кролячі моноклональні антитіла. Другий шар формували немічені антитіла кози до кролячого IgG. Третій шар складався з комплексу кролячих антитіл до пероксидази, зв'язаних з пероксидазою (ПАП-комплекс). реакцію візуалізували за допомогою 3-аміно-9-етилкарбазола (Nova Castra, United Kingdom). В місцях зв'язування антигену спостерігалося червоне забарвлення. Виявлено ознаки місцевого імунодефіциту з пригніченням регуляторно-хелперної (CD4) та ефекторної (CD8) ланок місцевого клітинного імунітету.

Представлені результати досліджень, проведених запропонованим способом, дозволяють зробити висновок, що він забезпечує високу інформативність аналізу функціонального стану слизової оболонки на глибокому структурному рівні.

Використання запропонованого способу оцінки функціонального стану слизової оболонки матки дозволить своєчасно діагностувати патологічні прояви стану слизової оболонки матки і обрати адекватну терапію.

За допомогою запропонованого способу оцінки функціонального стану слизової оболонки матки було обстежено 63 пацієнтки. Спостереження за ними, протягом двох років, дає підставу зробити висновок про його високу інформативність та ефективність.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков Підписне Тираж 26 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601