

УКРАЇНА



# ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 129070

**СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЕТАПІВ ПЕРЕБІГУ САРКОЇДОЗУ  
ЛЕГЕНЬ ТА ВНУТРІШНЬОГРУДНИХ ЛІМФАТИЧНИХ  
ВУЗЛІВ**

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

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.10.2018.

Заступник міністра економічного розвитку і торгівлі України

М.І. Тітарчук





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129070** (13) **U**

(51) МПК (2018.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)  
**G01N 1/28** (2006.01)  
**A61K 39/00**

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2018 02464</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>12.03.2018</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.10.2018</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.10.2018, Бюл.№ 20</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Бойко Дмитро Миколайович (UA), Ніколенко Дмитро Євгенійович (UA), Бойко Оксана Сергіївна (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</b></p>
--	--

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЕТАПІВ ПЕРЕБІГУ САРКОЇДОЗУ ЛЕГЕНЬ ТА ВНУТРІШНЬОГРУДНИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ**

**(57) Реферат:**

Спосіб визначення етапів перебігу саркоїдозу легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів включає застосування імуногістохімічного методу дослідження патоморфологічних змін у гранульомах лімфатичних вузлів хворих на саркоїдоз легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів. При цьому як маркери використовують антитіла до Т-лімфоцитів, асоційованих з передачею міжклітинних сигналів - CD3 (моноклон Sp7), до антигену, специфічного для активованих форм В-лімфоцитів CD20 Ab-1 (моноклон L26), до сіалмуцину, що експресується клітинами моноцитарно-маркофагальної системи CD68 Ab-3 (моноклон KP1), до Collagen IV - компоненту базальних мембран Ab-4 (моноклон PHM-12) з послідуною оцінкою активності запалення, етапності перебігу хвороби та терапії системними ГКС.

**UA 129070 U**

Корисна модель належить до медицини, а саме - пульмонології і може бути застосована для визначення активності запального процесу та імунної відповіді у хворих на саркоїдоз легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів при загостренні захворювання, спонтанній ремісії та лікуванні системними глюкокортикостероїдами (ГКС).

5 Відомий спосіб стосується використання морфологічних ознак активації елементів імунної системи: Т- та В-клітин, макрофагів у місці гранулематозного запалення з вивільненням різних хемокінів і цитокінів [Yamashita M. Mouri T. Niisato M. et al. Heterogeneous characteristics of lymphatic microvasculatures associated with pulmonary sarcoid granulomas. Ann. Am. Thorac. Soc. 2013. 10(2): 90-97.]. Недоліком цього методу є оцінка локальних патоморфологічних ознак  
10 запалення у хворих на саркоїдоз без урахування етапності перебігу саркоїдозу легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб визначення особливостей перебігу гранулематозного запалення у хворих на саркоїдоз легень [Govender P. Berman J.S. The Diagnosis of Sarcoidosis. Clin. Chest Med. 2015. 36(4): 585-602.]. Цей спосіб вибраний як  
15 найближчий аналог.

Однак, суттєвим недоліком цього методу є недостатня деталізація патоморфологічних ознак активності запалення в лімфатичних вузлах хворих на саркоїдоз легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів у співставленні з оцінкою ефективності лікування системними ГКС.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення етапів перебігу саркоїдозу легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів для підвищення якості діагностики та лікування хворих.  
20

Поставлена задача вирішується застосуванням імуногістохімічного методу дослідження патоморфологічних змін у гранульомах лімфатичних вузлів хворих на саркоїдоз легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів з використанням антитіл до Т-лімфоцитів, асоційованих з передачею міжклітинних сигналів - CD3 (моноклон Sp7), до антигену, специфічного для активованих форм В-лімфоцитів CD20 Ab-1 (моноклон L26), до сіалмуцину, що експресується клітинами моноцитарно-макрофагальної системи CD68 Ab-3 (моноклон KP1), до Collagen IV - компоненту базальних мембран Ab-4 (моноклон PHM-12) з послідовною оцінкою активності запалення, етапності перебігу хвороби та терапії системними ГКС.  
25

30 Запропонований спосіб здійснюється наступним чином:

1 етап - частину матеріалу ексцизійної біопсії ураженого лімфатичного вузла шиї фіксують в 10% розчині нейтрального формаліну, проводять по стандартній методиці через спирти, заливають в парафін. З усіх шматочків виготовляють серійні зрізи товщиною 4-5 мкм з наступним забарвленням гематоксиліном та еозином для оглядової мікроскопії і встановлення формального діагнозу: саркоїдоз лімфатичного вузла.  
35

2 етап - імуногістохімічне дослідження виконують на парафінових зрізах товщиною 4-5 мкм з використанням антитіл до Т-лімфоцитів, асоційованих з передачею міжклітинних сигналів - CD3 (моноклон Sp7), до антигену, специфічного для активованих форм В-лімфоцитів CD20 Ab-1 (моноклон L26), до сіалмуцину, що експресується клітинами моноцитарно-макрофагальної системи CD68 Ab-3 (моноклон KP1), до Collagen IV - компоненту базальних мембран Ab-4 (моноклон PHM-12). Титр антитіл підбирається індивідуально з використанням як розчинника - antibody diluent (фірма Thermo). Проведення реакції здійснюють відповідно до протоколів, рекомендованих фірмою-виробником моноклональних антитіл.  
40

Високотемпературне антигенне демаскування відбувається шляхом кип'ятіння зрізів у цитратному буфері (рН 6.0) в автоклаві при температурі +121 °С впродовж 8 хв. Інкубацію з первинними антитілами проводять впродовж 30 хв. при температурі +23-35 °С у вологій камері, з вторинними - впродовж 30 хв. Далі на препарати наносять хромоген (DAB, Thermo), що формує коричневе забарвлення у місці цільового антигену. Зрізи контрастують гематоксиліном Майєра для диференціювання структур тканини лімфовузла.  
45

3 етап - реакцію зв'язування антиген (АГ) + антитіло (АТ) візуально спостерігають у світловому мікроскопі та ідентифікують місце розташування імунного комплексу за коричневим забарвленням.  
50

4 етап - отримані результати мікроскопічного дослідження оцінюють за гістологічною структурою, імуногістохімічною функціональною активністю саркоїдозних гранульом та локалізацією найбільш інтенсивної експресії відповідних маркерів в клітинних асоціаціях, серед яких імуногістохімічним маркером загострення саркоїдозу є інтенсивна експресія CD68 (маркер активного синтезу цитоплазматичного ферменту сіалмуцину моноцитами-макрофагами) та CD3 (активні зрілі Т-лімфоцити) і CD20 (активні зрілі В-лімфоцити); маркерами спонтанної ремісії саркоїдозу є виражена експресія Collagen IV фібробластами на фоні помірної експресії CD68  
55

макрофагів, CD3 Т-лімфоцитів та CD20 В-лімфоцитів; маркерами пролікованого ГКС саркоїдозу є слабка експресія CD68 макрофагами та переважно CD3 Т-лімфоцитами.

Ефективність способу визначення етапів перебігу саркоїдозу легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів була доведена клінічним дослідженням.

5 До аналізу залучено результати морфологічного дослідження 5 пацієнтів (двоє жінок та троє чоловіків; вікові межі: 42-59 років), хворих на саркоїдоз. Ступінь активності захворювання визначали за сукупністю характерних клініко-інструментальних даних [Бойко М.Г. Бойко Д.М. Вплив глюкокортикостероїдів на динаміку клінічної симптоматики та системні значення про- та протизапальних цитокінів у хворих на саркоїдоз. Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. 10 2012. 4 (11): 52-56.]. Пацієнти були включені у дослідження за наявності в анамнезі результатів біопсії лімфатичних вузлів в активній фазі до лікування ГКС (1 хворий), під час загострення саркоїдозу на фоні лікування ГКС (2 пацієнта) та під час спостереження за спонтанною ремісією саркоїдозу без лікування (2 пацієнта). Для встановлення клітинного складу та оцінки активності запальної реакції у біопсійному матеріалі отриманого із уражених лімфатичних вузлів хворих на 15 саркоїдоз, нами були застосовані специфічні імуногістохімічні (ІГХ) маркери: до Т-лімфоцитів, асоційованих з передачею міжклітинних сигналів (CD3); до антигену специфічного для активованих форм В-лімфоцитів (CD20); до сіалмуцину, що експресується клітинами моноцитарно-макрофагальної системи (CD68); та колагену IV типу (Collagen IV) - фібрилярного протеїну, компоненту базальних мембран [Петров С.В. Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Титул: Казань, 2008.]. Як первинні 20 антитіла використовували CD3 (моноклон sp7, фірма Thermo), CD20 Ab-1 (моноклон L26, фірма Thermo), CD68 Ab-3 (моноклон KP1, фірма Thermo), колаген (Collagen) IV Ab-4 (моноклон PNM-12, фірма Thermo). Титр антитіл підбирався індивідуально з використанням як розчинника спеціального розчину antibody diluent (Thermo). Наступний етап ІГХ дослідження проводили з 25 використанням системи візуалізації останнього покоління Quanto (Thermo). Ідентифікація реакції проводилась завдяки нанесенню хромогену (DAB (Thermo). Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра. Кількісні та якісні показники експресії маркерів вивчали як мінімум на 8-10 випадково обраних полях зору мікроскопа гістологічних зрізів при збільшенні  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ , та  $\times 1000$  (коли це було необхідно). Оцінка 30 експресії маркера проводилась індивідуально у відповідності з рекомендаціями інших дослідників [Петров С.В. Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Титул: Казань, 2008.].

Для осередків продуктивного запалення (гранульом) в лімфатичному вузлі при саркоїдозі під час загострення захворювання притаманне переважання макрофагальної інфільтрації з 35 вираженим ступенем синтезу сіалміцину CD 68 (+++), нечисельними Т-лімфоцитами CD 3 (+), відсутністю В-лімфоцитів CD 20 (-) у центральному відділі гранульоми та вираженою запальною інфільтрацією з переважанням Т-лімфоцитів CD 3 (+++) навколо кровоносних мікросудин, з помірною присутністю клітин моноцитарно-макрофагального ряду CD 68 (++) , а також великою кількістю активованих форм В-лімфоцитів CD 20 (+++) у периферичних відділах.

40 На фоні терапії ГКС виявлено зменшення площі продуктивного запалення у центральних відділах гранульоми у вигляді макрофагальної інфільтрації з помірним ступенем синтезу сіалміцину CD 68 (++) , поодиноких Т-лімфоцитів CD 3 (+), відсутності В-лімфоцитів CD 20 (-) та слабка вираженої периваскулярної запальної інфільтрації з переважанням Т-лімфоцитів CD 3 (++) , з нечисельними клітинами моноцитарно-макрофагального ряду CD 68 (+) і активними 45 формами В-лімфоцитів CD 20 (+) в периферичних відділах.

Без лікування ГКС в осередках продуктивного запалення хворих на саркоїдоз зафіксована макрофагальна інфільтрація з вираженим (+++) і помірним (++) ступенем синтезу сіалміцину CD68, нечисленні CD3 Т-лімфоцити в центральній частині гранульоми та зростання кількості 50 кровоносних мікросудин, що експресують Collagen IV (++) , виражена (+++) навколо судинна запальна інфільтрація з переважанням CD3 Т-лімфоцитів, помірна (++) присутність клітин моноцитарно-макрофагального ряду CD 68 та активованих форм В-лімфоцитів CD20 (+++) на її периферії.

Таким чином, запропонований спосіб визначення етапів перебігу саркоїдозу легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів показав свою ефективність у підвищення якості 55 діагностики та лікування хворих.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

60 Спосіб визначення етапів перебігу саркоїдозу легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів, що включає застосування імуногістохімічного методу дослідження патоморфологічних змін у

гранульомах лімфатичних вузлів хворих на саркоїдоз легень та внутрішньогрудних лімфатичних вузлів, який відрізняється тим, що як маркери використовують антитіла до Т-лімфоцитів, асоційованих з передачею міжклітинних сигналів - CD3 (моноклон Sp7), до антигену, специфічного для активованих форм В-лімфоцитів CD20 Ab-1 (моноклон L26), до сіалмуцину, що експресується клітинами моноцитарно-макрофагальної системи CD68 Ab-3 (моноклон KP1), до Collagen IV - компоненту базальних мембран Ab-4 (моноклон PHM-12) з послідуною оцінкою активності запалення, етапності перебігу хвороби та терапії системними ГКС.

*(The following table content is extremely faint and largely illegible due to low contrast and blurring in the original document. It appears to be a table with multiple columns and rows of text.)*

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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