



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57688 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 1/28
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ КЕЛОЇДНОГО І ГІПЕРТРОФІЧНОГО РУБЦІВ В ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОМУ ПЕРІОДІ

1

(21) u201009613

(22) 02.08.2010

(24) 10.03.2011

(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.

(72) БАРАНОВСЬКИЙ ЮРІЙ ГЕННАДІЙОВИЧ,
ИЛЬЧЕНКО ФЕДІР МИКОЛАЙОВИЧ, КОСЕНКО
ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ

(73) БАРАНОВСЬКИЙ ЮРІЙ ГЕННАДІЙОВИЧ

(57) Спосіб диференційної діагностики келоїдного і гіпертрофічного рубців в післяопераційному періоді, що включає заливку шматочка рубця в парафін і приготування гістологічних парафінових зрізів з

2

наступним їх забарвленням барвниками, який **відрізняється** тим, що проводять забарвлення зрізів з використанням лектинів карагани і золотого дощу, кон'югованих з пероксидазою хрому, далі оцінюють гістотопографію глікополімерів та інтенсивність забарвлення клітин епідермісу і дерми, та при величині інтенсивності забарвлення лектином карагани 1-4 бали і лектином золотого дощу 1-4 бали діагностують розвиток гіпертрофічного рубця, при значенні інтенсивності забарвлення лектином карагани 1-2 бали і лектином золотого дощу 1-2 бали діагностують розвиток келоїдного рубця.

Корисна модель відноситься до області медицини, зокрема до хірургії і патологічної анатомії, і може бути використана в ранньому післяопераційному періоді при прогнозуванні формування патологічного рубця та ймовірності розвитку гіпертрофічного або келоїдного рубця.

В якості прототипу вибраний спосіб диференційної діагностики келоїдного і гіпертрофічного рубців в післяопераційному періоді [Келоидные рубцы / под ред. В.В. Шафранова. - 1-е изд. - М., 2003. - 192с.], який полягає в тому, що шматочок рубця заливають у парафін, готують гістологічні зрізи і забарвлюють їх гематоксиліном та еозином, потім оцінюють в полі зору мікроскопа, причому в гіпертрофічному рубці оцінюють кількість шарів в епідермісі і наявність грубих колагенових волокон у дермі, а в келоїдному - визначають епідерміс, субепідермальну зону, зону росту і глибоку зону, тобто чотири зони.

Ознаками, які співпадають із суттєвими ознаками способу, що заявляється, є: заливка шматочка рубця в парафін і приготування гістологічних парафінових зрізів з наступним їх забарвленням барвниками.

Причинами, які перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення точності та якості діагностики патологічного рубця, що формується на ранніх строках його розвитку), є: визначення виду патологічного рубця після його

формування тільки через 4-6 тижнів, неможливість на ранніх строках після хірургічного втручання або інших пошкоджень шкірних покривів діагностувати вид рубця, тобто майбутній гіпертрофічний або келоїдний рубець, що не дозволяє призначати своєчасно його специфічне лікування, коли воно найбільш ефективно на ранніх стадіях розвитку рубця.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу-прототипу шляхом забарвлення гістологічних парафінових зрізів рубця, що формується з використанням лектинів, кон'югованих з пероксидазою хрому, що дозволяє проводити визначення локалізації глікополімерів в клітинах і позаклітинних структурах епідермісу і дерми патологічного рубця, що дозволяє досягти очікуваного технічного результату.

Поставлена задача рішається тим, що в способі диференційної діагностики келоїдного і гіпертрофічного рубців в післяопераційному періоді, який включає заливку шматочка рубця в парафін і приготування гістологічних парафінових зрізів з наступним їх забарвленням барвниками, згідно корисної моделі, проводять забарвлення зрізів з використанням лектинів карагани і золотого дощу, кон'югованих з пероксидазою хрому, далі оцінюють гістотопографію глікополімерів та інтенсивність забарвлення клітин епідермісу і дерми, та при величині інтенсивності забарвлення лектином кара-

(13) U

(11) 57688

(19) UA

гани 1-4 бали і лектином золотого дощу - 1-4 бали діагностують розвиток гіпертрофічного рубця, при значенні інтенсивності забарвлення лектином карагани 1-2 бали і лектином золотого дощу - 1-2 бали діагностують розвиток келоїдного рубця.

Між сукупністю суттєвих ознак запропоновано-го способу та очікуваним технічним результатом простежується наступний причинно-слідчий зв'язок: використання забарвлення лектинами карагани і золотого дощу, кон'югованих з пероксидазою хрому гістологічних зрізів біоптатів патологічного рубця, що формується та подальша оцінка гістотопографії глікополімерів і інтенсивності забарвлення клітин епідермісу і дерми, дозволяє визначити вид рубця, що розвивається, в ранні строки після хірургічного втручання або інших пошкоджень шкірних покривів, а також розпочати його своєчасне специфічне лікування.

Спосіб, що заявляється, диференційної діагностики келоїдного і гіпертрофічного рубців в післяопераційному періоді застосований у лікуванні 40 хворих. Вік хворих становив від 30 до 70 років. Ускладнень не було.

Спосіб полягає в наступному.

Біоптати рубців через два тижні після оперативного втручання або інших пошкоджень фіксують 10%-м нейтральним формаліном не менше 12 годин; потім проводиться проводка в спиртах зростаючої концентрації 70% - 20 хвил., 80% - 20 хвил., 96% I - 15 хвил. і 96% II - 15 хвил.; потім проводка по ксилолам - I, II ксилол по 5 хвил. і III ксилол - 10 хвил., після чого проводиться заливка в парафін. Зрізи виконуються на мікромомі для світлової мікроскопії товщиною 5-7 мкм.

Парафінові зрізи наносяться на скельця без овальбуміну і висушуються в термостаті упродовж 48-72 годин при температурі 42°-45°С. Депарафінізація здійснюється в двох ксилолах, після чого проводиться дегідратація в спиртах. Потім препарати переносяться в забуферений ізотонічний розчин 3IP, 8 г NaCl, 0,2 г KCl, 1 г Na₂PO₄·12H₂O і 0,1 М Na₂PO₄ при рН7,4. Кон'югат лектину з пероксидазою розводять 3IP і наносять на зрізи при кімнатній температурі протягом 45-60 хвил. Розведення здійснювалось в концентрації, рекомендованій НВК "Лектинотест", згідно паспорта лектинів. Після цього препарати, поміщені в темну камеру, обробляють тричі в 3IP по 5 хвил., а потім в 3IP з 0,005%-м 3,3'-діамінобензидином і 0,015%-м H₂O₂ упродовж 0,5-5 хвил. Потім препарати промивають дистильованою водою, проводять дегідратацію в спиртах зростаючої концентрації і заключають в канадський бальзам.

Виявляють різну гістотопографію та оцінюють кількість глікополімерів з кінцевою вуглеводною детермінантою N-ацетил-D-галактозаміну - рецептори лектину карагани і альфа-L-фукози - рецептори лектину золотого дощу в клітинах і позаклітинних структурах епідермісу і дерми майбутнього гіпертрофічного або келоїдного рубця.

Далі визначають величину інтенсивності забарвлення клітин епідермісу і дерми патологічного рубця.

Інтенсивність забарвлення лектинами позначають в балах.

Як відсутню - 0 балів, слабку - 1 бал, помірну - 2 бали, сильну - 3 бали та дуже сильну - 4 бали.

При величині інтенсивності забарвлення лектином карагани 1-4 бали та величині інтенсивності забарвлення лектином золотого дощу 1-4 бали діагностують розвиток гіпертрофічного рубця.

При величині інтенсивності забарвлення лектином карагани 1-2 бали і величині інтенсивності забарвлення лектином золотого дощу 1-2 бали діагностують розвиток келоїдного рубця.

Аналіз одержаних результатів показав, що в майбутньому келоїдному рубці рецепторів лектину карагани дуже мало тільки в клітинах базального і рогового шарів. Волокна дерми також бідні бензидиновою міткою. Порівняно багато N-ацетил-D-галактозамінокон'югатів експресують тільки молоді фібробласти зони росту.

У гіпертрофічному рубці, що дозріває, клітини епідермісу багаті місцями зв'язування лектину карагани, особливо цитолема епітеліоцитів базального і рогового шарів. В дермі сама велика кількість N-ацетил-D-галактозамінокон'югатів синтезується фібробластами.

У келоїдному рубці, що формується, епідерміс бідний рецепторами лектину золотого дощу. Вони є в помітній кількості тільки в клітинах рогового шару. Дерма багата фукозкон'югатами, особливо клітини і волокна зони росту.

Епідермоцити всіх шарів епідермісу гіпертрофічного рубця, що розвивається, експресують дуже багато місць зв'язування лектину золотого дощу. Також ними багаті всі компоненти дерми.

В таблиці 1 наведені зміни гістотопографії і кількості рецепторів лектинів карагани і золотого дощу в епідермісі і дермі гіпертрофічного і келоїдного рубця, що формується, у осіб, які два тижні тому перенесли хірургічне втручання.

Запропонований спосіб ілюструється наступними прикладами його виконання.

Приклад 1.

Хворий Ш., 1985 р.н., перебував на лікуванні в хірургічному відділенні. Через 2 тижні після хірургічного втручання хворому була проведена діагностика по запропонованому способу. Був досліджений лектиногістохімічним методом біоптат патологічного рубця, що формується.

Величина інтенсивності забарвлення клітин епідермісу і дерми лектином карагани склала 1-4 бали.

Величина інтенсивності забарвлення клітин епідермісу і дерми лектином золотого дощу була 1-4 бали.

Аналіз одержаних результатів показав, що формується гіпертрофічний рубець.

Хворому було призначено відповідне лікування.

Приклад 2.

Хворий Ф., 1947 р.н., перебував на лікуванні в хірургічному відділенні. Через два тижні після хірургічного втручання був досліджений лектиногістохімічним методом біоптат патологічного рубця, що формується.

Величина інтенсивності забарвлення клітин епідермісу і дерми лектином карагани склала 1-2 балів.

Величина інтенсивності забарвлення клітин епідермісу і дерми лектином золотого дощу склала 1-2 балів.

Аналіз одержаних результатів показав формування келоїдного рубця. Призначено відповідне лікування. Ускладнень не було.

Наведені приклади підтверджують ефективність запропонованого способу.

Спосіб, що заявляється простий та більш інформативний, легко виконується в умовах патогістохімічної лабораторії. Дозволяє діагностувати гіпертрофічний або келоїдний рубець, що розвивається, через два тижні після хірургічного втручання або інших ушкоджень шкірних покривів, коли клінічно це зробити неможливо, також дає можливість використати його для раннього початку лікування гіпертрофічного або келоїдного рубця.

Таблиця 1

Назва структури	Гіпертрофічний рубець		Келоїдний рубець	
	Лектин карага-ни	Лектин золотого дощу	Лектин карага-ни	Лектин золотого дощу
Епідерміс Клітини базального шару цитолема	4	4	0	0
цитоплазма	2	3	1	1
Клітини шиповатого шару цитолема	3	3	0	1
цитоплазма	1	1	0	0
Клітини зернистого шару цитолема	3	3	0	1
цитоплазма	1	1	0	0
Клітини рогового шару цитолема	4	4	1	2
цитоплазма	4	4	1	2
Дерма волокна	2	3	1	3
Клітини цитолема	3	4	2	3
цитоплазма	3	4	1	2