



УКРАЇНА

(19) UA (11) 55825 (13) U  
(51) МПК (2009)  
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 ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ КЕЛОЇДНОГО І ГІПЕРТРОФІЧНОГО РУБЦІВ У ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОМУ ПЕРІОДІ**

1

(21) u201007481

(22) 15.06.2010

(24) 27.12.2010

(46) 27.12.2010, Бюл.№ 24, 2010 р.

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

(73) КРИМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІ-  
ВЕРСИТЕТ ІМ. С.І. ГЕОРГІЄВСЬКОГО, БАРА-  
НОВСЬКИЙ ЮРІЙ ГЕННАДІЙОВИЧ

(57) Спосіб прогнозування розвитку келоїдного і гіпертрофічного рубців в післяопераційному періоді, що включає заливку шматочка рубця в парафін, приготування гістологічних зрізів та наступне забарвлення їх барвниками, який відрізняється

2

тим, що проводять забарвлення зрізів імуногістохімічно з використанням первинних моноклональних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому, для визначення білків Ki-67, Bcl-2, p53, CD 95, далі оцінюють кількість рецепторів, визначають індекси проліферації і апоптозу та, при індексі проліферації 81-100%, а індексі апоптозу 0-10%, діагностують розвиток гіпертрофічного рубця, при індексі проліферації 81-100%, а індексі апоптозу 81-100% - келоїдного рубця, а при індексах проліферації та апоптозу в межах 51-80% - прогнозують можливий розвиток рубця, при індексі проліферації 0-10%, а індексі апоптозу 81-100% - рубець не розвивається.

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 найближчого аналога вибраний спосіб прогнозування розвитку келоїдного і гіпертрофічного рубців в післяопераційному періоді (Шафранов В.В., Борхунова Е.Н., Таганов А.В. и др. Келоидные рубцы. Под ред. В.В. Шафранова. - 1-е изд. - М., 2003. - 192с.), який заключається в тому, що шматочок рубця заливають в парафін, готують гістологічні зрізи і забарвлюють їх гематоксиліном і еозином, потім оцінюють в полі зору мікроскопа, причому в келоїдних рубцях визначають чотири зони - епідерміс, субепідермальна зона, зона росту і глибока зона, а в гіпертрофічному рубці оцінюють кількість шарів в епідермісі і наявність грубих колагенових волокон в дермі.

Ознаками, які співпадають із суттєвими ознаками заявляемого способу, є: заливка шматочка рубця в парафін, приготування гістологічних зрізів та наступне забарвлення їх барвниками.

Технічним результатом корисної моделі є: підвищення точності оцінки виду патологічного рубця, що формується, на ранніх строках його розвитку.

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату, є: оцінка виду патологічного рубця тільки після його формування через 4-6 тижнів, у зв'язку з чим виникає складність оцінки після хірургічного втручання або інших пошкоджень шкірних покривів, тобто за даним методом визначити майбутній гіпертрофічний або келоїдний рубець досить важко, неможливо діагностувати вид рубця на ранніх стадіях розвитку, коли його специфічне лікування найбільш ефективно.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу-прототипу шляхом зміни забарвлення гістологічних парафінових зрізів рубця, що формується, за рахунок застосування імуногістохімічного методу з використанням первинних моноклональних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому, що дозволяє проводити визначення активності процесів проліферації та апоптозу клітин епідермісу, дерми патологічного рубця, що є більш інформативним та дозволяє досягти очікуваний технічний результат.

(19) UA (11) 55825 (13) U

Поставлена задача рішається тим, що в способі прогнозування розвитку келоїдного і гіпертрофічного рубців в післяопераційному періоді, що включає заливку шматочка рубця в парафін, приготування гістологічних зрізів та наступне забарвлення їх барвниками, згідно корисної моделі, проводять забарвлення зрізів імуногістохімічно з використанням первинних моноклональних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому, для визначення білків Ki-67, Bcl-2, p53, CD 95, далі оцінюють кількість рецепторів, визначають індекси проліферації і апоптозу, та при індексі проліферації 81-100%, а індексі апоптозу 0-10% діагностують розвиток гіпертрофічного рубця, при індексі проліферації 81-100%, а індексі апоптозу 81-100% - келоїдного рубця, а при індексах проліферації та апоптозу в межах 51-80% - прогноують можливий розвиток рубця, при індексі проліферації 0-10%, а індексі апоптозу 81-100% - рубець не розвивається.

Між сукупністю суттєвих ознак запропонованого способу та очікуваним технічним результатом простежується наступний причинно-слідчий зв'язок: використання імуногістохімічного методу забарвлення гістологічних парафінових зрізів біопатів патологічного рубця, що формується, первинними моноклональними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому, з подальшою кількісною оцінкою рецепторів та визначенням індексів проліферації та апоптозу, за величиною яких судять про можливість розвитку рубця, дозволяє виявити різну активність процесів проліферації та апоптозу клітин епідермісу і дерми майбутнього гіпертрофічного або келоїдного рубця, тобто оцінити вид рубця, що розвивається вже через два тижні після хірургічного втручання або інших ушкоджень шкірних покривів, та почати його специфічне лікування, яке дозволить найбільш ефективно в ранні строки проводити профілактику розвитку рубця.

Спосіб заключається в наступному.

Біоптати рубців через два тижні після оперативного втручання або інших ушкоджень фіксують 10%-м забуференим нейтральним формаліном не довше 24 годин. Потім проводять проводку в спиртах зростаючої концентрації - 70% - 20 хвил., 80% - 20 хвил., 96% I - 15 хвил. і 96% II - 15 хвил., далі здійснюють проводку по ксилолам - I, II ксилол по 5 хвил. і III ксилол - 10 хвил., після чого проводять заливку в парафін. Зрізи виготовляють на мікромомі для світлової мікроскопії товщиною 5-7мкм і поміщають на адгезивні скельця, покриті полілізіном.

Депарафінізацію здійснюють в двох ксилолах, після чого проводять дегідратацію в спиртах. Для вивільнення антигенів після фіксації формаліном використовують теплове демаскування антигенів у мікрохвильовій печі "Samsung" при потужності 800Вт протягом 10 хвилин в цитратному буфері при pH 6,0.

Далі наносять на отримані зрізи по черзі розчини з моноклональними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому на присутність білків Ki-67, CD 95, p53 і до Bcl-2.

Розчин з моноклональними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому до рецепторів Ki-

67 дозволяє ідентифікувати ядерний антиген, присутній у більшості проліферуючих клітин. Для оцінки процесів програмованої клітинної загибелі в клітинах патологічних рубців використовують розчини моноклональних антитіл для визначення білків CD 95, p53 і Bcl-2.

В якості розчинника моноклональних антитіл використали розчин ANTIBODY DILUENT виробник фірми Dako Cytomation.

Оптимальна температура інкубації 24°C протягом 10-30 хвилин, залежно від типу і розведення антитіла. Подальшу обробку проводять за допомогою системи візуалізації LSAB фірми DAKO упродовж 10 хвилин з кожним реактивом з біотинильованими антитілами і стрептавидин-пероксидазним комплексом.

Потім після інкубації розчином моноклональних антитіл, наносять хромоген DAB фірми Dako Cytomation, оцінюють якість взаємодії під контролем мікроскопа впродовж від 20 секунд до 3 хвилин.

Для адекватного представлення структури тканини зрізи додатково забарвлюють гематоксиліном Майєра впродовж 3 хвилин. Потім препарати промивають дистильованою водою, проводять дегідратацію в спиртах зростаючої концентрації і заключають в канадський бальзам.

Індекс проліферації та індекс апоптозу визначають на 40 випадково вибраних полях зору мікроскопа гістологічних зрізів при збільшенні  $\times 1350$  після підрахунку 1000 ядер або клітин відповідно з наступним обчисленням індексів у відсотках у середньому за результатами всіх вивчених біопатів.

В епідермісі келоїдного рубця виявляються активні процеси проліферації. Мітка локалізується в ядрах клітин базального шару - на 100 клітин приходить 85% $\pm$ 0,01 проліферуючих клітин, що представляє собою індекс проліферації. В шиповатому шарі індекс проліферації - 26% $\pm$ 0,002. Експресія білка CD 95 була виявлена в клітинах базального і шиповатого шару. На 100 клітин базального шару мітка локалізується на мембранах і в ядрах 86% $\pm$ 0,02 клітин, 86% $\pm$ 0,02 - індекс апоптозу. На 100 клітин шиповатого шару приходить 34% $\pm$ 0,002, клітини з мітками в цитоплазмі або ядрі, 34% $\pm$ 0,002 - індекс апоптозу. В дермі мітки немає. Bcl-2 присутній в клітинах росткового шару епідермісу молодих келоїдних рубців. На 100 епітеліоцитів базального шару приходить 16% $\pm$ 0,03, клітини з Bcl-2, 16% $\pm$ 0,03 - індекс апоптозу. На 100 епітеліоцитів шиповатого шару приходить 11% $\pm$ 0,002 - клітини з міткою, 11% $\pm$ 0,002 - індекс апоптозу.

В глибокій зоні і зоні росту дерми зустрічаються округлі клітини з міткою. Такі клітини лежать у капілярах і між колагеновими волокнами поза капілярів. Значить, такі клітини проліферують, у них є Ki-67 позитивні рецептори, і вони не вступають в апоптоз. В епідермісі білок p53 експресується в епідермоцитах росткового шару. На 100 епітеліоцитів базального шару приходить 95% $\pm$ 0,02 - клітин з міткою в ядрі, 95% $\pm$ 0,02 - індекс апоптозу. На 100 епітеліоцитів шиповатого шару виявлено 14% $\pm$ 0,001 - клітин з міткою, 14% $\pm$ 0,001 - індекс апоптозу. Це свідчить, що незважаючи на активні

процеси проліферації, кератиноцити також активно елімінуються за рахунок процесів апоптозу, який відбувається активніше, ніж проліферація. В зоні росту спостерігається активна проліферація клітин, апоптоз яких інгібується Bcl-2.

У гіпертрофічному рубці спостерігається активна проліферація клітин росткового шару. На 100 епітеліоцитів базального шару приходить 81 $\pm$ 0,02 - клітини з міткою Ki-67 в ядрі, 81 $\pm$ 0,02 - індекс проліферації. На 100 епітеліоцитів шиповатого шару мітка є в 24 $\pm$ 0,001-клітинах, 24 $\pm$ 0,001 - індекс проліферації. В дермі мітка відсутня. Білок p53 зустрічається в 6 $\pm$ 0,01 - клітинах базального шару, 6 $\pm$ 0,01 - індекс апоптозу і в 9 $\pm$ 0,0001 - клітинах шиповатого шару, 9 $\pm$ 0,0001 - індекс апоптозу.

В дермі мітка відсутня. В гіпертрофічних рубцях процес апоптозу явно недостатній, що призводить до стовщення епідермісу. На 100 клітин базального шару мітка CD 95+ молекул є на мембранах і в ядрах 42 $\pm$ 0,02 - клітин, 42 $\pm$ 0,02 - індекс апоптозу, а на 100 клітин шиповатого шару - в 11 $\pm$ 0,001 клітинах, 11 $\pm$ 0,001 - індекс апоптозу. В дермі мітка відсутня. На 100 клітин базального шару 27 $\pm$ 0,02 клітин містить активований ген Bcl-2, 27 $\pm$ 0,02 - індекс апоптозу. В клітинах шиповатого шару і дерми мітка відсутня.

В епідермісі процеси апоптозу пригнічені на тлі підсиленої проліферації епідермоцитів, що призводить до його гіпертрофії.

В таблиці наведені індекси проліферації та апоптозу в епідермісі і дермі гіпертрофічного та келоїдного рубця, що формуються у осіб, які два тижні тому перенесли хірургічне втручання.

Критерії оцінки індексу апоптозу і проліферації наступні.

Індекс проліферації від 0-10% свідчить про низьку активність, що не сприяє розвитку рубця, низька ймовірність розвитку патологічного процесу або рубця.

Індекс проліферації 51-80% - середня активність, можливість розвитку рубця.

Індекс проліферації 81-100% - висока активність, тобто є можливість розвитку гіпертрофічного або келоїдного рубця.

Індекс апоптозу 0-10% - низька активність, тобто можливий розвиток гіпертрофічного або келоїдного рубця.

Індекс апоптозу 51-80% - середня активність, тобто є можливість розвитку рубця.

При індексі проліферації від 81% до 100%, а індексі апоптозу від 0% до 10% - відбувається розвиток гіпертрофічного рубця.

При індексі проліферації від 81% до 100%, а індексі апоптозу 81-100% - розвивається келоїдно-ий рубець.

При індексі проліферації та індексі апоптозу в межах 51-80% - можливий розвиток рубця.

При індексі проліферації 0-10%, а індексі апоптозу від 81% до 100% - рубець не розвивається.

Запропонований спосіб ілюструється наступними прикладами його виконання.

#### Приклад 1

Хвора Л., 42 роки, перебувала на лікуванні в хірургічному відділенні. Через 2 тижні після хірургічного втручання був досліджений імуногістохімічним методом біоптат патологічного рубця, що формується, для визначення білків Ki-67, CD 95, p53 і Bcl-2.

Індекс проліферації становить - 85%, індекс апоптозу становить - 95%.

Аналіз одержаних результатів показав, що формується келоїдний рубець.

Хворій призначено відповідне лікування.

#### Приклад 2

Хворий Н., 35 років, перебував на лікуванні в хірургічному відділенні. Через два тижні після хірургічного втручання був досліджений імуногістохімічним методом біоптат патологічного рубця, що формується, для визначення білків Ki-67, CD 95, p53 і Bcl-2.

Індекс проліферації становить - 81%, індекс апоптозу становить - 6%.

Аналіз одержаних результатів показав, що формується гіпертрофічний рубець.

Призначено відповідне лікування.

Наведені приклади підтверджують ефективність запропонованого способу.

Заявляемый спосіб прогнозування розвитку келоїдного і гіпертрофічного рубців у післяопераційному періоді застосований у лікуванні 49 хворих. Вік хворих становить від 27 до 68 років. Ускладнень не було.

Заявляемый спосіб простий та інформативний, легко виконується в умовах імуногістохімічної лабораторії. Дозволяє діагностувати гіпертрофічний або келоїдний рубці, що розвиваються через два тижні після хірургічного втручання або інших пошкоджень шкірних покривів, коли клінічно це зробити неможливо.

Даний спосіб дає можливість використати його для раннього початку лікування гіпертрофічного або келоїдного рубця.

Таблиця

Назва структури	Келоїдний рубець				Гіпертрофічний рубець			
	Ki-67	Fas (CD 95)	Bcl-2	p53	Ki-67	Fas (CD 95)	Bcl-2	p53
Клітини базального шару епідермісу	85%±0,01	86%±0,02	16%±0,03	95%±0,02	81%±0,02	6%±0,02	27%±0,02	6%±0,01
Клітини шиповатого шару епідермісу	26%±0,002	34%±0,002	11%±0,002	14%±0,001	24%±0,001	11%±0,001	-	9%±0,000
Дерма	-	-	-	-	-	-	-	-
Клітини округлої форми навколо судин дерми	+	-	+	-	-	-	-	-