



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **87388** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 08399	(72) Винахідник(и): Вовк Іраїда Борисівна (UA), Кондратюк Валентина Костянтинівна (UA), Калюта Аліна Олександрівна (UA), Задорожна Тамара Данилівна (UA), Пустовалова Ольга Іванівна (UA), Подолька Дмитро Володимирович (UA), Чубей Галина Валеріївна (UA), Трохимович Ольга Віталіївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 04.07.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.02.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.02.2014, Бюл.№ 3	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. П. Майбороди, 8, м. Київ, 04050 (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ РАННІХ НЕОПЛАСТИЧНИХ ЗМІН ЕПІТЕЛІЮ ШИЙКИ МАТКИ ПРИ ПАПІЛОМАВІРУСНОМУ ІНФІКУВАННІ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики ранніх неопластичних змін епітелію шийки матки при папіломавірусному інфікуванні вирішується шляхом застосування загальновідомих методик обстеження, причому додатково проводиться імуноцитохімічне дослідження по визначенню онкопротеїну p16INK4a в клітинах епітелію шийки матки, причому відмічається різний ступінь вираженості експресії білка p16: від слабопозитивної та помірної (1-2 бали) до вираженої (3 бали), що свідчить про зростаючий ризик у таких хворих пухлинної трансформації епітеліальних клітин шийки матки та може бути неінвазивним діагностичним маркером несприятливого перебігу фонових та передпухлинних процесів шийки матки.

UA 87388 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до гінекології, та може бути використана для комплексної діагностики стану шийки матки, зокрема, для визначення ранніх неопластичних змін епітелію шийки матки.

Діагностика і лікування захворювань, асоційованих з вірусом папіломи людини (ВПЛ), є досить складною та актуальною задачею сучасної гінекології. В теперішній час існує достатньо даних, що підтверджують зв'язок між папіломавірусною інфекцією (ПВІ) та передпухлинними захворюваннями шийки матки. ДНК ВПЛ виявляється майже у всіх хворих з передпухлинними станами та раком шийки матки (РШМ), в зв'язку з чим Міжнародне агентство по дослідженню раку (IARC) офіційно оголосило ВПЛ типів 16 і 18 канцерогенними факторами (Bosch A., 2005; Роговская С.И., 2008; Прилепская В.Н., 2012). В макроорганізмі віруси не завжди викликають захворювання, встановлено транзиторне та постійне (персистуюче) носійство ВПЛ. Останнє згодом призводить до цервікальної інтраепітеліальної неоплазії легкого ступеня (CINI), потім середнього і тяжкого, яка завершується розвитком інвазивного РШМ. Приблизно у 70 % пацієнток відбувається елімінація ВПЛ протягом 12-24 місяців. Типи високого онкогенного ризику персистують довше, ніж низькоонкогенні типи (Катханова О.В., 2009).

Відомий спосіб оцінки стану шийки матки у жінок, інфікованих ВПЛ [Пат. 52774], в якому проводиться молекулярно-біологічна діагностика вірусу папіломи людини з визначенням вірусного навантаження та встановлення порогу клінічно значущої кількості вірусу. Однак недоліком даного способу є відсутність стандартизованого методичного підходу до визначення порогових значень кількості вірусної ДНК, коли вони стають клінічно значущими.

Також відомий спосіб імунологічної діагностики активності папіломавірусної інфекції у дівчат і жінок раннього репродуктивного віку [Пат. 52819], в якому проводиться визначення субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові та концентрації імуноглобулінів цервікального слизу або змиву з піхви; підвищення вмісту активованих Т-лімфоцитів та Т-природних кілерів у периферичній крові, а також підвищення співвідношення $\text{IgA}:\text{IgA}$ у цервікальному слизу або змивах з піхви є несприятливими факторами, що відображають розвиток імунної реакції у відповідь на високу активність папіломавірусної інфекції. Проте існуючий спосіб є малодоступним та потребує високої вартості, що не дає можливості використовувати його в повсякденній практиці.

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб оцінки стану шийки матки у жінок, інфікованих папіломавірусом людини [Пат. 63127], який полягає у проведенні полімеразно-ланцюгової реакції з використанням зеленого фільтру для виявлення атипових судин на поверхні екзоцервіксу. Однак недоліком даного способу є відсутність можливості прогнозувати перебіг інфекції та розвиток цервікальної неоплазії.

В основу корисної моделі способу діагностики ранніх неопластичних змін епітелію шийки матки при папіломавірусному інфікуванні поставлена задача визначення рівня експресії білка р16 (від 1-ого до 3 балів) в цитологічних мазках жінок з фоновими захворюваннями шийки матки в залежності від наявності інфікування вірусом папіломи людини, завдяки вирішенню цієї задачі буде покращена діагностика фонових та передпухлинних процесів шийки матки, що дасть змогу виділити групу жінок-носіїв вірусу папіломи людини з несприятливим прогнозом перебігу захворювання та застосувати своєчасні лікувальні заходи, тим самим зменшити частоту раку шийки матки.

Поставлена задача способу діагностики ранніх неопластичних змін епітелію шийки матки при папіломавірусному інфікуванні вирішується шляхом застосування загальновідомих методик обстеження, що згідно корисної моделі, для виявлення тканинного маркера p16INK4a (інгібітор цикліна залежних кіназ Cdk 4, 6) в клітинах епітелію шийки матки додатково використовується CINtec з моноклональним антитілом (Monoclonal anti p16INK4a protein (clone JC8)) для якісного визначення онкопротеїну p16 в цитологічних препаратах імуноцитохімічним методом, причому відмічається різний ступінь вираженості експресії білка p16: від слабопозитивної та помірної (1-2 бали) до вираженої (3 бали), що свідчить про зростаючий ризик у таких хворих неопластичної професії епітеліальних клітин шийки матки.

Спосіб здійснюється наступним чином: для виявлення змін епітеліального покриву шийки матки застосовується методика розширеної кольпоскопії із використанням 3 % розчину оцтової кислоти та розчину Люголя при збільшенні мікроскопу (кольпоскопа) у 7-30 разів.

Молекулярно-біологічна методика діагностики ВПЛ проводиться методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) за допомогою тест-систем для ампліфікації гомологічних фрагментів ДНК ВПЛ низького (типи 6, 11-й) та високого (типи 16, 18, 31, 33-й) онкогенного ризику.

При проведенні цитологічного дослідження з метою виявлення особливостей морфологічних змін клітин епітелію шийки матки, характеру запальної інфільтрації (нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, макрофаги), наявності неопластичних змін в клітинах епітелію, мазки

беруться з піхвової поверхні шийки матки та з цервікального каналу спеціальною щіточкою "Cervex-Brush" для отримання матеріалу із зони трансформації, з наступним їх забарвленням за Романовським-Гімзе та Папаніколау та дослідженням препаратів в прохідному світлі на дослідницькому мікроскопі "Olympus BH-2" (Японія).

Імуноцитохімічний метод - непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії антигену інгібітора кіназ CdK4,6-білка p16INK4a (CIN-тест для виявлення неопластичних змін в клітинах епітелію шийки матки). Принцип методу полягає у виявленні експресії антигену p16 (INK4a/CDKN2a) за допомогою первинних і вторинних Kit моноклональних антитіл до антигену p 16. Розповсюдженість та інтенсивність імуноцитохімічної реакції оцінювали напівкількісним методом в балах, від 0 до 3

Спосіб характеризується наступними прикладами:

Приклад 1. Хвора Л., 26 років. Госпіталізована у відділення "Планування сім'ї та оперативної реабілітації репродуктивної функції жінок" з діагнозом: Безплідність II, поєднаного ґенезу. Хронічний двобічний сальпінгоофорит. Ерозія шийки матки. Вагініт.

Пацієнтці проведено обстеження шийки матки, що включало визначення вірусу папіломи людини методом ПЛР діагностики, розширену кольпоскопію, цитологічне дослідження та імуноцитохімічне дослідження для визначення експресії білка p16. При цьому було виявлено інфікування низькоонкогенними типами ВПЛ (16-й, 18-й), при розширеній кольпоскопії візуалізувались ознаки, що відповідають доброякісній незавершеній зоні трансформації, цервіциту; при цитологічному дослідженні цервікального матеріалу встановлений тип мазка III а (ознаки легких диспластичних змін епітелію шийки матки, помірна запальна інфільтрація); проведення імуноцитохімічного дослідження показало слабопозитивну експресію (до 1-го бала) білка p16.

Хворій була призначена поетапна комплексна терапія запальних захворювань шийки матки з використанням препаратів етіотропної, імуномодуючої та противірусної дії, ефективність якої оцінювалась шляхом проведення ПЛР, розширеної кольпоскопії та цитологічного дослідження в динаміці лікування. В подальшому пацієнтці було рекомендовано спостереження один раз на 6 міс.

Приклад 2. Хвора Н., 34 роки. Госпіталізована у відділення "Планування сім'ї та оперативної реабілітації репродуктивної функції жінок" з діагнозом: Хронічний двобічний сальпінгоофорит в стадії загострення. Спайковий процес органів малого тазу. Ерозія шийки матки. Вагініт.

Пацієнтці проведено комплексне обстеження шийки матки, що включало визначення вірусу папіломи людини методом ПЛР діагностики, розширену кольпоскопію, цитологічне дослідження та імуноцитохімічне дослідження для визначення експресії білка p16. При цьому було виявлено інфікування високоонкогенними типами ВПЛ (16-й, 18-й), при розширеній кольпоскопії візуалізувались ознаки, що відповідають легким диспластичним змінам епітелію шийки матки (CIN I), в межах доброякісної незавершеної зони трансформації, цервіциту; при цитологічному дослідженні цервікального матеріалу встановлений тип мазку III а (легкі диспластичні зміни епітелію шийки матки, койлоцити, клітини плоского епітелію з проявами гіпер- та паракератозу, помірна запальна інфільтрація); проведення імуноцитохімічного дослідження показало виражену експресію (до 3-х балів) білка p 16.

Пацієнтці була призначена поетапна комплексна терапія запальних захворювань шийки матки з використанням препаратів етіотропної, імуномодуючої та противірусної дії, ефективність якої оцінювалась шляхом проведення ПЛР, розширеної кольпоскопії та цитологічного дослідження в динаміці лікування. В подальшому рекомендовано спостереження 1 раз на 6 міс. та консультація онколога.

Таким чином, спосіб діагностики ранніх неопластичних змін епітелію шийки матки при папіломавірусному інфікуванні у жінок дає можливість визначити активність вірусу папіломи людини та оцінити найближчі перспективи перебігу інфекції як предиктора ранньої неопластичної прогресії, що, в свою чергу, дозволяє виділити групу жінок-носіїв ВПЛ з несприятливим прогнозом та запобігти розвитку раку шийки матки, який може бути застосований в спеціалізованих поліклініках та стаціонарах.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики ранніх неопластичних змін епітелію шийки матки при папіломавірусному інфікуванні, що вирішується шляхом застосування загальновідомих методик обстеження, який **відрізняється** тим, що додатково проводиться імуноцитохімічне дослідження по визначенню онкопротеїну p16INK4a в клітинах епітелію шийки матки, причому відмічається різний ступінь вираженості експресії білка p16: від слабопозитивної та помірної (1-2 бали) до вираженої (3

бали), що свідчить про зростаючий ризик у таких хворих пухлинної трансформації епітеліальних клітин шийки матки та може бути неінвазивним діагностичним маркером несприятливого перебігу фонових та передпухлинних процесів шийки матки.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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