



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **70026**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/68 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 13125**

(22) Дата подання заявки: **07.11.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.05.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.05.2012, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Хоперія Вікторія Геннадіївна (UA),
Гузь Ольга Олександрівна (UA),
Белемець Наталія Іванівна (UA)**

(73) Власник(и):

**УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ
ЦЕНТР ЕНДОКРИННОЇ ХІРУРГІЇ,
ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕНДОКРИННИХ
ОРГАНІВ І ТКАНИН МОЗ УКРАЇНИ,
Кловський узвіз, 13-А, м. Київ, 01021 (UA)**

(54) СПОСІБ ПЕРЕДОПЕРАЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ФОЛІКУЛЯРНИХ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

(57) Реферат:

Спосіб передопераційної діагностики фолікулярних пухлин щитоподібної залози шляхом дослідження "маркерів злоякісності". Визначення активності дипептидил-амінопептидази IV (ДАП IV) та тиреоїдної пероксидази (ТПО) проводять в одному біопсійному матеріалі, і за кількістю клітин, які вступили в реакцію, та за індексом їх активності при значеннях ДАП IV ≤ 4 та ТПО ≥ 60 % визначають доброякісність, а при ТПО < 60 % та ДАП IV > 4 - злоякісність процесу.

UA 70026 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до патоморфології, ендокринології, і може бути використана для передопераційної диференційної діагностики злоякісних новоутворень щитоподібної залози (ЩЗ).

Відомі способи диференційної діагностики злоякісних новоутворень щитоподібної залози, які полягають в дослідженні ядерних білків [high mobility group I proteins (HMG1 (Y)], що беруть участь у процесах регуляції структури і функції хроматину [1], цитокератину 19, галектину-3, який є регулятором функції інших протеїнів, розпізнаючи їх специфічні карбогідратні радикали [2]. Однак недоліком цих способів діагностики є їх низька ефективність у діагностиці фолікулярного раку щитоподібної залози.

Найближчим аналогом є спосіб визначення ферментів, таких як тиреоїдна пероксидаза (ТПО) та дипептидил-амінопептидаза - IV (ДАП-IV). ТПО - це мембранний ферментативний білок, який каталізує йодинацію тирозилових залишків і зв'язування йодтирозинів в процесі синтезу тиреоїдних гормонів. ТПО забезпечує нормальну функцію ЩЗ і її недостатність призводить до зменшеного поглинання йоду та порушення гормонального синтезу залози. Дослідження молекулярних змін у пухлинах ЩЗ показали, що вже на ранніх стадіях росту пухлини визначаються зміни у експресії тиреоїдної пероксидази [3]. Під час імуногістохімічного дослідження пухлин ЩЗ із використанням моноклональних антитіл (МоАт 47) було встановлено, що одні із цих антитіл (ТПО 47) реагують із епітеліальними клітинами нормальної ЩЗ і доброякісними пухлинами органа, а при злоякісних новоутвореннях позитивна реакція з антитілами спостерігається у 3,1 % випадків.

ДАП IV є клітинним ферментом, що активно бере участь в онкогенезі ЩЗ і цитохімічне визначення ДАП IV розглядають як маркер злоякісності клітин [4].

Недоліки цих способів полягають в обмеженні застосування матеріалу, узятим під час оперативного втручання, що робить неможливим їх застосування у передопераційній діагностиці, а також при проведенні скринінгових досліджень.

Задачею корисної моделі є підвищення ефективності передопераційної діагностики фолікулярних пухлин щитоподібної залози для вибору раціональної тактики втручання та покращення результатів лікування на основі імуноцитохімічного та цитохімічного дослідження цитологічного препарату, отриманого шляхом тонкоіголкової аспіраційної пункційної біопсії.

Поставлена задача вирішується тим, що шляхом дослідження "маркерів злоякісності" - біогенних речовин - дипептидил-амінопептидази - IV (ДАП-IV) та тиреоїдної пероксидази (ТПО) за допомогою визначення моноклональних антитіл, що дають можливість виявляти характер структурно-функціональних змін у тканині в процесі її пухлинної трансформації.

Заявлений спосіб здійснюється наступним чином.

Під контролем ультразвукового дослідження з використанням голок 25G здійснюють пункцію вузлів ЩЗ. Для цитологічного дослідження аспірати забарвлюють за методом Май-Грюнвальда-Гімза (МГГ). Для імуноцитохімічного дослідження аспірати фіксують впродовж 24 годин при температурі 4 °C, в подальшому для інактивації ендогенної пероксидази інкубують 10 хвилин у 0,3 % розчині перекису водню. Активність ферменту досліджують із використанням моноклональних антитіл ТПО-47 (Coger, Франція) у розведенні 1:50 із застосуванням стрептавідин-біотин-пероксидазного універсального набору (DAKO Glostrup, Denmark) за рекомендованою методикою [5].

Для цитохімічного визначення активності дипептидил-амінопептидази IV аспіраційний матеріал фіксують і забарвлюють відповідно до методичних рекомендацій, описаних Aratake Y. та ін [6].

Із аспірату кожного вузла ЩЗ готують 4 цитологічні препарати, 2 з яких забарвлювали за методом Май-Грюнвальд-Гімза і для 2 інших проводили імуноцитохімічне визначення ТПО із МоАт 47 та цитохімічне визначення активності ДАП IV.

Для оцінки результатів імунологічної реакції з МоАт 47 підраховують відсоток клітин, що прореагували із антитілами, а також враховують якість і розташування реакції у цитоплазмі клітин. Моноклональні антитіла 47 проти ТПО специфічно зв'язуються із епітопом молекули тиреоїдної пероксидази у цитоплазмі тироцита доброякісних захворювань залози. Доброякісними вважають утворення, у цитологічних препаратах яких відсоток позитивно маркованих фолікулярних клітин є понад 60 %, злоякісними - ті, у цитологічних препаратах яких кількість фолікулярних клітин, що прореагували із МоАт 47, не перевищує 60 %.

У клітинах злоякісних новоутворень реакція із МоАт 47 відсутня (Фіг. 1). Зникнення або зниження реакції в даному випадку відбувається за рахунок якісних або кількісних змін молекули ТПО, що свідчить про зміну антигенної експресії епітопу, який специфічно розпізнається МоАт 47.

Результат імуноцитохімічного дослідження з МоАт 47 виявлявся у вигляді забарвлення цитоплазми різних відтінків коричневого кольору. Цитоплазматичне маркування було гомогенним, носило дифузний характер, найбільше концентрувалося у перинуклеарному просторі, формуючи чіткий обідок навколо ядра (Фіг. 2). Така реакція в наших дослідженнях
 5 була специфічною тільки для фолікулярних клітин залози і не виявлялась у лімфоцитах, гістіоцитах, макрофагах. У випадках відсутності її в клітинах, забарвлених гематоксиліном, цитоплазма і ядра мали блакитний колір (реакція була відсутньою).

Активність ДАП IV оцінювали за якісними показниками реакції (інтенсивність забарвлення) та за кількістю клітин, що прореагували (відсоток позитивно маркованих фолікулярних клітин).

10 Інтенсивність забарвлення визначалась індексами від 1 до 3 (1 - слабка, 2 - помірна, 3 - виражена). Відсоток маркованих клітин позначали індексами від 0 до 4. Загальний індекс реакції визначали шляхом множення індексу інтенсивності на індекс відсотку маркованих клітин.

Доброякісним вважали процес, де загальний індекс активності ДАП IV складав від 0 до 3, злоякісними такий, де загальний індекс активності ДАП IV був >4.

15 Позитивна реакція ДАП IV виявляється у цитоплазмі клітин у вигляді забарвлення червоно-коричневого кольору різної інтенсивності. Цитоплазма була гомогенною, забарвлення носило дифузний характер, хоча інколи, більш інтенсивним воно залишалось навколо ядра. Позитивна реакція виявлялась як в фолікулярних клітинах, так і в макрофагах, (Фіг. 3, 4)

20 Імуноцитохімічне дослідження ТПО з МоАт 47 полегшує диференційну діагностику добро- та злоякісних пухлин ЩЗ, а цитохімічне визначення активності ДАП IV маркером злоякісного процесу. Обидва методи можуть застосовуватись як скринінговий тест для всіх пацієнтів із вузловими утвореннями щитоподібної залози.

Заявлений спосіб ілюструється наступним його виконанням.

Приклад 1

25 Хвора С. 57 років. Історія хвороби № 96. Направлена в УНПЦЕХ на обстеження та лікування. Діагноз при госпіталізації: вузловий нетоксичний зоб III ст. З анамнезу відомо, що вузол у щитоподібній залозі з 1991 р. При клінічному обстеженні в правій частці щитоподібної залози пальпується пухлиноподібне утворення розмірами 3×4 см, тугоеластичне, рухоме. Периферичні лімфатичні вузли не збільшені. Клінічно визначався еутиреоз. Рівні ТТГ, Т₃, Т₄ та
 30 антитиреоїдної пероксидази відповідали віковим нормам. За даними ультразвукового дослідження у правій частці ЩЗ із переходом на перешийок визначалось гіпоехогенне утворення округлої форми 4×3×2,5 см. Хворій було проведено ТАПБ вузла правої частки. Цитологічний висновок: в аспіратах з вузла правої частки визначаються епітеліальні клітини з вираженими ознаками проліферації та атипії. Імуноцитохімічне визначення ТПО з МоАт 47-
 35 10 %, активність ДАП IV-9.

Хворій було проведено оперативне втручання. Патологогістологічний висновок: Фолікулярний рак щитоподібної залози, широка інвазія.

Приклад 2

40 Хворий Н., 34 роки. Історія хвороби № 834. Діагноз при госпіталізації: лівобічний вузловий нетоксичний зоб III ст. Клінічно було виявлено асиметричне збільшення ЩЗ за рахунок лівої частки. Клінічно визначався еутиреоз. Рівні ТТГ, Т₃, Т₄ та антитиреоїдної пероксидази відповідали віковим нормам. За даними ультразвукового дослідження у лівій частці ЩЗ визначалось гіпоехогенне утворення округлої форми 5×4×3 см. Хворому було проведено ТАПБ вузла лівої частки. Цитологічний висновок: цитологічні ознаки характерні для мікрофолікулярних
 45 вузлів щитоподібної залози. Визначаються епітеліальні клітини з вираженими ознаками проліферації. Імуноцитохімічне визначення ТПО з МоАт 47-100 %, активність ДАП IV-0.

Хворому було проведено оперативне втручання. Патологогістологічний висновок: Мікрофолікулярна аденома щитоподібної залози.

Спосіб, що пропонується, був успішно апробований на матеріалі аспіратів вузлів ЩЗ, отриманих під час тонкоігловидної аспіраційної пункційної біопсії від 240 хворих. Згідно з отриманими результатами, при комплексному застосуванні зазначених методів хибно-негативні результати відсутні, а діагностична чутливість в подібних випадках складає 100 %, тобто відсутній ризик не діагностувати рак ЩЗ. Використовуючи цей метод, вдається досягти підвищення діагностичної специфічності (96 %), у порівнянні із стандартним цитологічним
 55 дослідженням. За умов комплексного використання даних методів дослідження за нашими даними діагностична ефективність цитологічного аналізу аспіратів ЩЗ складає 96,6 %.

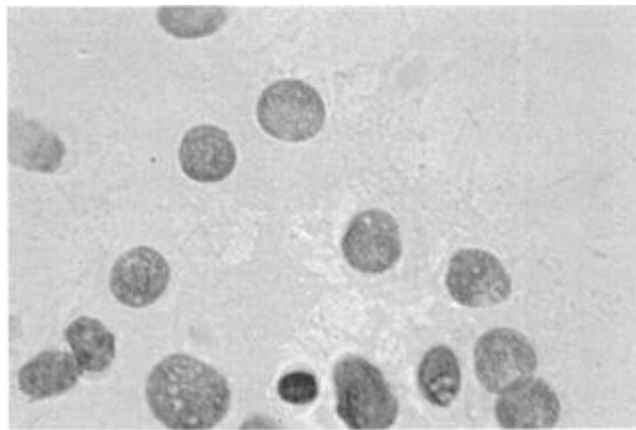
Джерела інформації:

1. Chiappetta G. et al. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma // Cancer Res.-1998. - Vol. 58, N 18. - P. 4193-4198.

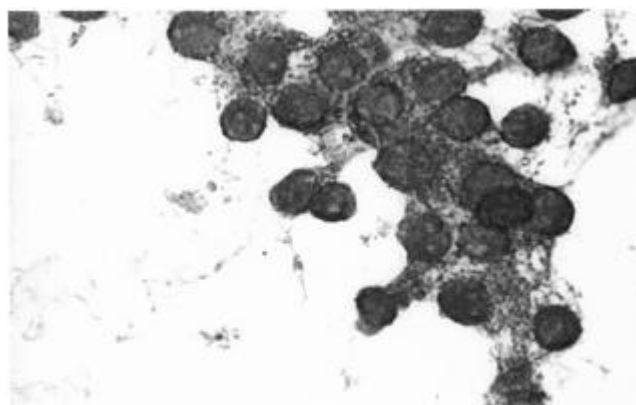
2. Bartolazzi A. et al. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions // Lancet. - 2001. - Vol.357, N9269. - P. 1644-1650.
3. Garcia S., Vassko V., Henry J.F., De Micco C. Comparison of thyroid peroxidase expression with cellular proliferation in thyroid follicular tumors // Thyroid. - 1998. - Vol. 8. - P. 745-749.
- 5 4. Iwabuchi H., Toriya K., Mimura T. et al. Staining for Dipeptidyl Aminopeptidase IV Activity in Nodular Thyroid Diseases // Acta Cytol. - 1996 - Vol. 40. - P. 158-163.
5. De Micco C. et al. Thyroid peroxidase immunodetection as a tool to assist diagnosis of thyroid nodules on fine-needle aspiration biopsy // Eur. J. Endocrinol. - 1994. - Vol. 131, N 5. - P. 474-479.
- 10 6. Aratake Y. et al. Dipeptidyl aminopeptidase IV staining of cytologic preparations to distinguish benign from malignant thyroid diseases // Am. J. Clin. Pathol. - 1991. - Vol. 96, N 3. - P. 306-310.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 Спосіб передопераційної діагностики фолікулярних пухлин щитоподібної залози шляхом дослідження "маркерів злоякісності", який **відрізняється** тим, що визначення активності дипептидил-амінопептидази IV (ДАП IV) та тиреоїдної пероксидази (ТПО) проводять в одному біопсійному матеріалі і за кількістю клітин, які вступили в реакцію, та за індексом їх активності при значеннях ДАП IV ≤ 4 та ТПО ≥ 60 % визначають доброякісність, а при ТПО < 60 % та ДАП IV > 4 - злоякісність процесу.



Фиг. 1



Фиг. 2

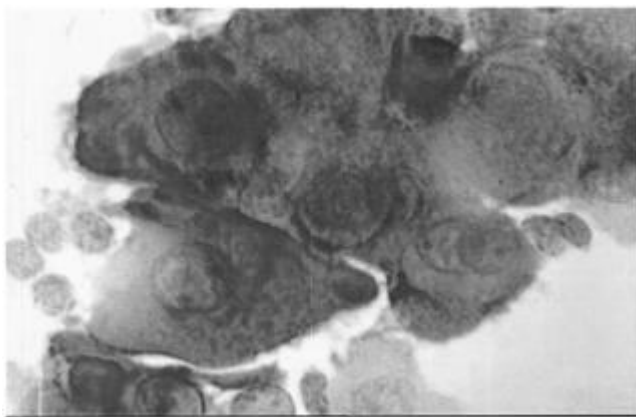


Fig. 3

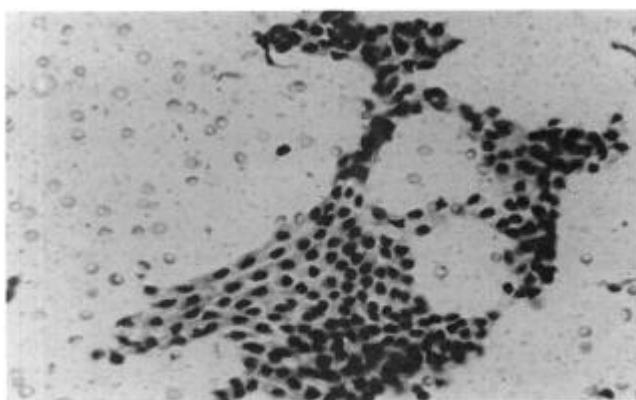


Fig. 4

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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