



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76763** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)

A61B 10/00

A61P 15/08 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 21/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 08945**

(22) Дата подання заявки: **20.07.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.01.2013**

(46) Публікація відомостей **10.01.2013, Бюл.№ 1**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Базалицька Світлана Василівна (UA),
Персидський Юрій Всеволодович (UA),
Романенко Аліна Михайлівна (UA),
Горпинченко Ігор Іванович (UA),
Нікітін Олег Дмитрійович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
УРОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053
(UA)**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ ГЕМАТОТЕСТИКУЛЯРНОГО БАР'ЄРУ

(57) Реферат:

Спосіб визначення стану гематотестикулярного бар'єру, що включає імуногістохімічне визначення експресії протеїну Claudin 11 в біоптаті яєчка у хворих на чоловічу неплідність.

UA 76763 U

Спосіб належить до галузі медицини, а саме до сексопатології, і може бути використаний для визначення особливостей стану гематотестикулярного бар'єру у чоловіків.

В чоловічій репродуктивній системі існує гематотестикулярний бар'єр, утворений щільними контактами між клітинами Сертолі (головний компонент) та структурами, які відокремлюють зрілі сперматозоїди від периферійної крові і запобігають їх взаємодії з імунокомпетентними клітинами. Різні фактори, що порушують цей бар'єр, призводять до виникнення імунних реакцій з утворенням в крові антитіл до епітелію сім'яних каналців та розвитку аутоімунної неплідності, оскільки сперматозоїди з'являються під час статевого дозрівання вже після того, як сформувалась імунна толерантність до власних тканин організму. Лабораторна діагностика імунної неплідності на сьогоднішній день включає в себе дослідження крові та сім'яної рідини на антиспермальні антитіла-імуноглобуліни G, A та M, які при взаємодії зі сперматозоїдами здатні їх іммобілізувати, аглютинізувати, блокувати процес пенетрації (проникнення) в яйцеклітину, унеможлижуючи процес запліднення, або блокувати процес імплантації ембріона, навіть при використанні допоміжних репродуктивних технологій. Порушення гематотестикулярного бар'єру завжди супроводжуються утворенням антиспермальних антитіл. Крім того, гематотестикулярний бар'єр виконує трофічну функцію, а також забезпечує в каналцях специфічне гормональне середовище, необхідне для сперматогенезу, в зв'язку з цим, порушення гематотестикулярного бар'єру - важливий чинник виникнення порушень сперматогенезу (оліго-, терато- і азооспермії). Тому, стан гематотестикулярного бар'єру - важливий діагностичний і прогностичний фактор, який необхідно враховувати в лікуванні чоловічої неплідності.

Молекулярними дослідженнями останніх років встановлено, що білки сімейства claudins складають основу щільних замикальних контактів, це трансмембранні білки. Нещодавні дослідження (нанотехнології) показали, що Claudin 11, який експресує переважно в щільних контактах між клітинами Сертолі, та Occludin - мембранний протеїн, який експресує в щільних контактах різних клітин, відіграють важливу роль в регуляції стану гематотестикулярного бар'єру та можуть слугувати як прогностичні маркери стану гематотестикулярного бар'єру та сперматогенезу.

Відомий спосіб визначення імуногістохімічної експресії протеїнів екстра-целюлярного матриксу та морфометричних показників в тканині яєчка, прийнятий як найближчий аналог(1), і полягає в імуногістохімічному визначенні експресії протеїнів fibronectin, vimentin, laminin, collagen type IV позаклітинного матриксу та морфометричних показників в перитубулярній тканині яєчка.

Недоліком даного способу є те, що визначають імуногістохімічні особливості протеїнів позаклітинного матриксу та морфометричні показники в перитубулярній тканині яєчка.

В основу корисної моделі поставлено задачу - удосконалити спосіб визначення стану гематотестикулярного бар'єру у чоловіків шляхом визначення імуногістохімічних особливостей експресії протеїну Claudin 11 в клітинах біоптата яєчка, які оцінюють в балах, і при наявності зрілих сперматозоїдів в каналцях визначають екскреторно-обтураційну форму неплідності, при їх відсутності - секреторну, та при значеннях імуногістохімічного коефіцієнта в клітинах Сертолі та ендотелії гемокапілярів $5,3 \pm 0,42$ бала і нижче - діагностують імунний компонент, що потребує додаткової корекції, імунних та секреторних порушень сперматогенезу, хворі же на секреторну неплідність, при значенні імуногістохімічного коефіцієнта в клітинах Сертолі $0,8 \pm 0,6$ бала і нижче, мають несприятливий прогноз щодо відновлення сперматогенезу.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення стану гематотестикулярного бар'єру, що включає імуногістохімічне визначення експресії протеїнів, згідно з корисною моделлю, визначають імуногістохімічні особливості експресії протеїну Claudin 11 в біоптаті яєчка у хворих на чоловічу неплідність, які оцінюють в балах, і при наявності зрілих сперматозоїдів в каналцях визначають екскреторно-обтураційну форму неплідності, при їх відсутності - секреторну та при значеннях імуногістохімічного коефіцієнта в клітинах Сертолі та ендотелії гемокапілярів $5,3 \pm 0,42$ бала і нижче діагностують імунний компонент, що потребує додаткової корекції імунних та секреторних порушень сперматогенезу, хворі же на секреторну неплідність, при значенні імуногістохімічного коефіцієнта в клітинах Сертолі $0,8 \pm 0,6$ бала і нижче, мають несприятливий прогноз щодо відновлення сперматогенезу.

Запропонований спосіб виконують наступним чином: для гістологічного дослідження біоптату тканини яєчка фіксують в рідині Буена і заливають в парафін, з парафінових блоків виготовляють зрізи завтовшки 5 мкм, які фарбують гематоксилін-еозином;

- імуногістохімічний аналіз здійснюють з використанням стандартного авідин-біотинового (АВБ) методу, при цьому біоптати фіксують у 12 % забуферному формаліні, заливають в парафін і виготовляють зрізи, які після депарафінізації в ксилолі і дегідратації в батареї спиртів,

для блокади активності ендогенної пероксидази, вміщують на 5 хвилин у 0,3 % розчин перекису водню, розведеному на фосфатному буфері (pH 7,4). Після промивання дистильованою водою зрізи інкубують у мікрохвильовій печі при температурі 98 °С в 0,1 М цитратному буфері (pH 6,0) протягом 30 хв. і негайно охолоджують. Далі зрізи преінкубують протягом 15 хв. у 1 % розчині конячого сироваткового альбуміну, розведеного на фосфатному буфері, інкубують з первинними антитілами Claudin 11 в розведенні 1:50 протягом 18 годин при температурі 4 °С. Далі зразки інкубують із вторинними кролячими поліклональними антитілами у вологій камері 30 хвилин при кімнатній температурі. Після чого зрізи інкубують в авідин-біотиновому комплексі (АВС) 30 хвилин при кімнатній температурі, який готують за 30 хвилин до використання. Кожний етап закінчують триразовим промиванням по 5 хв. у фосфатному буфері. Після проявлення 1-2 хв. у 0,05 % розчині діамінбензидину зрізи дофарбовують гематоксиліном та поміщають в канадський бальзам. Як позитивний контроль використовують зрізи тканин із відомим заздалегідь високим вмістом протеїну Claudin 11, як негативний - служать зрізи без обробки первинними антитілами.

В кожному випадку для імуногістохімії аналізують 12-16 зрізів. Розповсюдженість та інтенсивність імуногістохімічної реакції оцінюють за напівкількісним методом в балах. Розповсюдженість реакції або кількість забарвлених ядер чи цитоплазми клітин оцінюють від 0 до 3 балів за такими критеріями: 0 - відсутність клітин із видимим забарвленням, 1 - забарвлено менше 10 % клітин, 2 - забарвлено більше 10 %, але менше 50 % клітин, 3 - рівномірно забарвлено більше 50 % клітин клітинного шару. Інтенсивність забарвлення ядер або цитоплазми оцінюють за такими критеріями: 0 - відсутність видимого забарвлення, 1 - слабо забарвлені ядра або цитоплазма, 2 - помірно забарвлені ядра або цитоплазма, 3 - інтенсивно забарвлені ядра або цитоплазма. Загальний результат імуногістохімічної реакції визначають за показниками імуногістохімічного коефіцієнта від 0 до 9 балів, який одержують перемноженням оцінок розповсюдженості та інтенсивності забарвлення. Проводять статистичний аналіз отриманих результатів.

Дані морфологічного дослідження біоптата яєчка пояснюють графічні зображення.

На Фіг. 1 представлена екскреторно-обтураційна неплідність. Виразна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (8 балів) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. x 200.

На Фіг. 2 - секреторна неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматоцитів 1 порядку. Помірна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (4 бали) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. x 200.

На Фіг. 3 - секреторна неплідність із синдромом "лише клітини Сертолі", слабка мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (2 бали) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. x 200.

Апробація запропонованого способу проведена у відділі патоморфології ДУ "Інститут урології НАМІ України" при дослідженні 28 хворих із азооспермією, матеріал отриманий під час інцизійної біопсії, з наступним гістологічним та імуногістохімічним дослідженням біоптату. Для встановлення клінічного діагнозу форми неплідності використовують загальноприйнятую класифікацію. При визначенні заключного діагнозу враховують дані морфологічного дослідження біоптата яєчка та результати гормональних досліджень.

Згідно з встановленим діагнозом пацієнтів розділено на три групи: 1 група - 11 хворих, у яких встановлений діагноз екскреторно-обтураційна неплідність, середній вік хворих складає 33,6 років; 2 група - 12 пацієнтів, у яких встановлено діагноз секреторної неплідності з блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид, середній вік хворих складає 29,5 років; 3 група - 5 пацієнтів, у яких встановлено діагноз секреторної неплідності із синдромом "лише клітини Сертолі", середній вік хворих складає 28,5 років.

Результати імуногістохімічної експресії протеїну Claudin 11, які визначають за показниками імуногістохімічного коефіцієнта, в біоптатах яєчка у хворих на екскреторно-обтураційну та секреторну форми чоловічої неплідності представлені в таблиці.

Таблиця

Показники імуногістохімічного коефіцієнта експресії протеїну Claudin 11 в біоптатах яєчка у хворих на екскреторно-обтураційну та секреторну форми чоловічої неплідності (в балах)

Структурні елементи біоптата яєчка	Форми неплідності у чоловіків		
	Екскреторно-обтураційна n=11	Секреторна n=12	Синдром "лише клітини Сертолі" n=5
Клітини Сертолі	7,4±0,45*	5,3±0,42*	0,8±0,6*
Ендотелій гемокапілярів	7,2±0,45*	5,3±0,42*	0,8±0,6*
Сперматогонії	2,1±0,18	1,5±0,17	-
Сперматоцити	2,1±0,18	1,5±0,17	-
Сперматиди	0	0	-
Сперматозоїди	0	-	-

* - достовірно між групами; $p \leq 0,001$

Як свідчать наведені в таблиці дані, при дослідженні імуногістохімічної експресії протеїну Claudin 11 в групі хворих на екскреторно-обтураційну неплідність із збереженим сперматогенезом (всього 11 пацієнтів), спостерігають помірне мембранозно-цитоплазматичне зафарбування (4-6 балів) клітин Сертолі в 6-ти спостереженнях (54,5 %), в п'яти випадках (45,5 %), було виявлено виразну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (7-9 балів) в суспензіях (Фіг. 1). Середнє значення імуногістохімічного коефіцієнта дорівнює 7,4±0,45 бала.

Клітини сперматогенного епітелію - сперматогонії, сперматоцити 1 і 2 порядку виявляють слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 1-3 бали в усіх 11 спостереженнях (100 %) даної групи. Середнє значення імуногістохімічного коефіцієнта становить 2,1±0,18 для цих клітин сперматогенного епітелію. Необхідно зазначити, що сперматиди та зрілі сперматозоїди характеризуються відсутністю імуногістохімічної експресії протеїну Claudin 11 (0 балів) в усіх 11 випадках (100 %).

В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів виявляють виразну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (7-9 балів) в п'яти випадках (45,5 %), а в шести спостереженнях (54,5 %) даної групи спостерігають помірну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 4-6 балів. Середнє значення імуногістохімічного коефіцієнта дорівнює 7,2±0,45 бала.

В групі хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид (всього 12 пацієнтів), спостерігають помірне мембранозно-цитоплазматичне зафарбування (4-6 балів) клітин Сертолі у 8-ми спостереженнях (66,7 %) (Фіг. 2) в чотирьох випадках (33,3 %) було виявлено слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (1-3 бали) в суспензіях. Середнє значення імуногістохімічного коефіцієнта дорівнює 5,43±0,42 бала.

Клітини сперматогенного епітелію - сперматогонії та сперматоцити 1 і 2 порядку, що виявлені в цій групі пацієнтів, характеризують слабку мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 в усіх спостереженнях (100 %) даної групи в 1-3 бали. Середнє значення імуногістохімічного коефіцієнта становить 1,5±0,17 бала для цих клітин сперматогенного епітелію.

В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів виявляють помірну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (4-6 балів) у восьми випадках (66,7 %), а в чотирьох випадках (33,7 %) даної групи спостерігають слабку мембранозно-цитоплазматична експресію протеїну Claudin 11 в 1-3 бали. Середнє значення імуногістохімічного коефіцієнта дорівнює 5,3±0,42 бала.

В групі хворих на секреторну неплідність із синдромом "лише клітини Сертолі" (всього 5 пацієнтів), в клітинах Сертолі спостерігають слабку мембранозно-цитоплазматичне зафарбування протеїну Claudin 11 в 1-3 бали в 2 спостереженнях (40 %) (Фіг. 3), в трьох випадках (60 %) мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 в суспензіях відсутня (0 балів). Середнє значення імуногістохімічного коефіцієнта становить 0,8±0,6 бала.

В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів спостерігають слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 1-3 бали у двох спостереженнях

(40 %) даної групи; в інших 60 % випадків експресія протеїну Claudin 11 відсутня (0 балів). Середнє значення імуногістохімічного коефіцієнта також дорівнює $0,8 \pm 0,6$ бала.

Отже, дослідження протеїну Claudin 11 виявляють статистично достовірне зниження його цитоплазматично-мембранозної експресії в клітинах Сертолі та ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів в групах хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид та із синдромом "лише клітини Сертолі" порівняно з пацієнтами із екскреторно-обтураційною неплідністю. Виявлені зміни імуногістохімічної експресії протеїну Claudin 11 свідчать про значні порушення гематотестикулярного бар'єру в групах хворих із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид та із синдромом "лише клітини Сертолі" при секреторній формі чоловічої неплідності.

Приклади практичного застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Хворий Д., і. хв. № 549 та № 1039, 33 р., безплідний шлюб протягом 3 років. Спермограма: клітин сперматогенезу та сперматозоїдів не виявлено, лейкоцити 1-2 в полі зору, фруктоза 13 ммоль/л. При лабораторних дослідженнях урогенітальної інфекції не виявлено. Гормональні дослідження: ФСГ (фолікулостимулюючий гормон), ЛГ (лютеїзуючий гормон), пролактин, тестостерон - в нормі. Виконана інцизійна біопсія правого яєчка. Біопсійний матеріал досліджений згідно з запропонованим способом. При гістологічному дослідженні в сім'яних канальцях виявлені численні сперматозоїди. Імуногістохімічна експресія протеїну Claudin 11 та показники імуногістохімічного коефіцієнта в структурних елементах біоптата яєчка становлять: в клітинах Сертолі - 7,3, в ендотелії гемокапілярів - 7,1 бала. Встановлений діагноз екскреторно-обтураційної неплідності (імунний компонент відсутній). Виконана операція епідидимовазоанастомозу. Через три місяці в спермограмі виявлені сперматозоїди 1×10^6 - $1,5 \times 10^6$ /мл.

Приклад 2. Хворий К., і. хв. № 425, 29 років, безплідний шлюб протягом 4 років. В анамнезі двосторонній епідидиміт. Спермограма: клітин сперматогенезу та сперматозоїдів не виявлено, лейкоцити 1-3 в полі зору, фруктоза 11 ммоль/л. При лабораторних дослідженнях урогенітальної інфекції не виявлено. Гормональні дослідження: ФСГ, ЛГ, пролактин, тестостерон - в нормі. Виконана інцизійна біопсія правого яєчка. Біопсійний матеріал досліджений згідно з запропонованим способом. При гістологічному дослідженні в сім'яних канальцях виявлені поодинокі зрілі сперматозоїди. Імуногістохімічна експресія протеїну Claudin 11 та показники імуногістохімічного коефіцієнта в структурних елементах біоптата яєчка становлять: в клітинах Сертолі - 4,4 бала, в ендотелії гемокапілярів - 4,3 бала. Встановлений діагноз екскреторно-обтураційної неплідності з ознаками пригнічення сперматогенезу, імунний компонент. Виконана операція епідидимовазоанастомозу. При контрольних дослідженнях після операції сперматозоїди в спермограмі не виявлені. Призначене лікування для ліквідації імунного компонента та корекції сперматогенезу: преднізолон в дозі 1,2 мг на кг маси тіла протягом 5 діб, потім - курс плазмаферезу (10-15 сеансів через день), а також аевіт -1 капсула на день протягом місяця; пентоксифілін по 800 мг протягом місяця; магнітотерапія (10-15 сеансів через день).

Приклад 3. Хворий С., і. хв. № 224, 36 років, безплідний шлюб протягом 7 років. Спермограма: клітин сперматогенезу та сперматозоїдів не виявлено, лейкоцити 0-2 в полі зору, фруктоза 13 ммоль/л. При лабораторних дослідженнях урогенітальної інфекції не виявлено. Дані гормональних досліджень (ФСГ, ЛГ, пролактин, тестостерон) в нормі. Виконана інцизійна біопсія правого яєчка. Біопсійний матеріал досліджений за запропонованим способом. При гістологічному дослідженні в сім'яних канальцях сперматозоїди не виявлені. Імуногістохімічна експресія протеїну Claudin 11 та показники імуногістохімічного коефіцієнта в структурних елементах біоптата яєчка становлять: в клітинах Сертолі - 3,4 бала, в ендотелії гемокапілярів - 3,3 бала. Встановлений діагноз секреторної неплідності з імунним компонентом. Призначене лікування для корекції сперматогенезу та імунного компоненту: аевіт - 1 капсула на день протягом місяця; пентоксифілін по 800 мг протягом місяця; магнітотерапія (10-15 сеансів через день), а також преднізолон в дозі 1,2 мг на кг маси тіла протягом 5 діб, потім - курс плазмаферезу (10-15 сеансів через день).

Приклад 4. Хворий П., і. хв. № 189, 25 років, безплідний шлюб протягом 3 років. Спермограма: клітин сперматогенезу та сперматозоїдів не виявлено, лейкоцити 0-1 в полі зору, фруктоза 14 ммоль/л. При лабораторних дослідженнях урогенітальної інфекції не виявлено. Дані гормональних досліджень (ФСГ, ЛГ, пролактин, тестостерон) в нормі. Виконана інцизійна біопсія правого яєчка. Біопсійний матеріал досліджений згідно з запропонованим способом. При гістологічному дослідженні в сім'яних канальцях клітини сперматогенезу та зрілі сперматозоїди не виявлені. Імуногістохімічна експресія протеїну Claudin 11 та показники імуногістохімічного

коефіцієнта в структурних елементах біоптата яєчка становлять: в клітинах Сертолі - 0,9 бала, в ендотелії гемокапілярів - 0,9 бала. Встановлений діагноз секреторної неплідності (синдром "лише клітини Сертолі") з виразним імунним компонентом. Прогноз відновлення сперматогенезу несприятливий. Пацієнту запропоноване використання допоміжних репродуктивних технологій.

Таким чином, при морфологічному дослідженні біоптату яєчка доведена доцільність визначення стану гематотестикулярного бар'єру за імуногістохімічною експресією протеїну Claudin 11 як важливого діагностичного і прогностичного показника в лікуванні чоловічої неплідності. Запропонований спосіб дає можливість встановити остаточний діагноз за результатами морфологічного дослідження структурних елементів біоптата яєчка: при наявності зрілих сперматозоїдів в канальцях - екскреторно-обтураційну, при їх відсутності - секреторну форму чоловічої неплідності та з урахуванням показників імуногістохімічних коефіцієнтів експресії протеїну Claudin 11 визначати наявність або відсутність імунного компонента, що дозволяє вибирати патогенетично обумовлене лікування чоловічої неплідності та корекцію порушень в кожному конкретному випадку та визначати подальший прогноз щодо відновлення сперматогенезу. Ефективність способу 98,9 %.

Джерела інформації:

1. Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoo-spermic man: an immunohistochemical and morphometric study// Gulkesen K.H., Erdogru T., Sargin C.F., Karpuzoglu G.// Asian J...Androl.-2002. - Vol. 4, N1. - P. 55-60 (найближчий аналог).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення стану гематотестикулярного бар'єру, що включає імуногістохімічне визначення експресії протеїнів, який **відрізняється** тим, що визначають імуногістохімічні особливості експресії протеїну Claudin 11 в біоптаті яєчка у хворих на чоловічу неплідність, які оцінюють в балах, і при наявності зрілих сперматозоїдів в канальцях визначають екскреторно-обтураційну форму неплідності, при їх відсутності - секреторну, та при значеннях імуногістохімічного коефіцієнта в клітинах Сертолі та ендотелії гемокапілярів $5,3 \pm 0,42$ бала і нижче діагностують імунний компонент, що потребує додаткової корекції імунних та секреторних порушень сперматогенезу, хворі на секреторну неплідність, при значенні імуногістохімічного коефіцієнта в клітинах Сертолі $0,8 \pm 0,6$ бала і нижче, мають несприятливий прогноз щодо відновлення сперматогенезу.

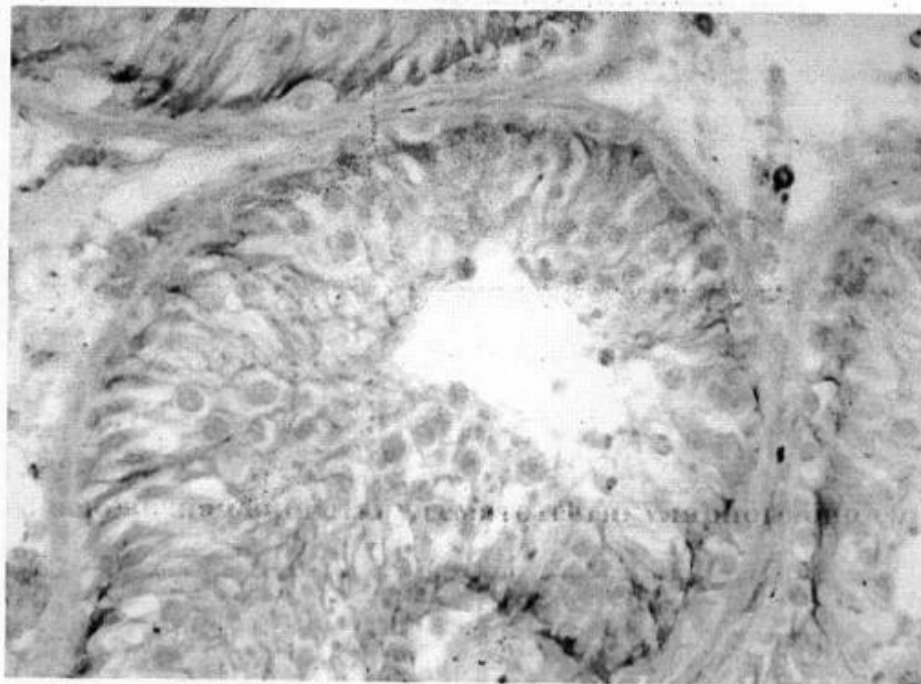


Fig. 1

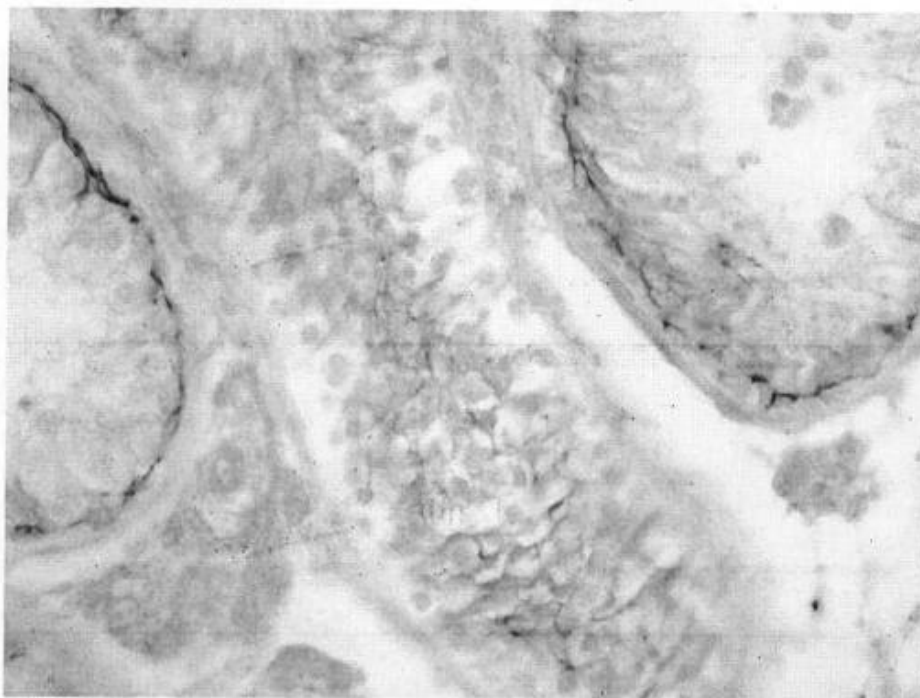


Fig. 2

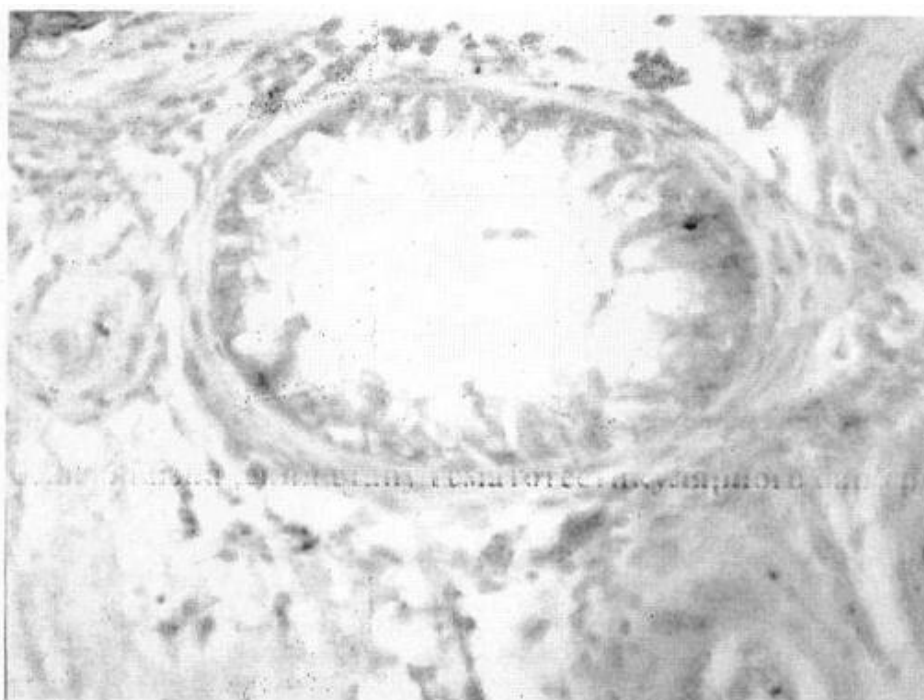


Fig. 3

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