



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **159399** (13) **U**
(51) МПК (2025.01)
A61B 5/00
G01N 33/483 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2024 05660	(72) Винахідник(и): Савчук Тетяна Василівна (UA), Лещенко Іван В'ячеславович (UA)
(22) Дата подання заявки: 29.11.2024	(73) Володілець (володільці): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бульв. Шевченка, 13, м. Київ, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 22.05.2025	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 21.05.2025, Бюл.№ 21	

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО МАРКЕРА

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення експресії імуногістохімічного маркера, при якому шматочки плаценти фіксують у 10 % нейтральному формаліні. Проводять через серію спиртів наростаючої концентрації, заливають у парафін, виготовляють зрізи тканини товщиною 4 мкм, фотографують через мікроскоп за допомогою цифрової фотокамери. При цьому зрізи фарбують імуногістохімічно з використанням моноклональних антитіл проти CD34, отримані фотографії завантажують у форматі JPEG на сервіс ONLINE JPG TOOLS, за допомогою якого визначають колір пікселя у фото та відсоток експресії імуногістохімічного маркера.

UA 159399 U

Корисна модель належить до медицини, а саме патологічної анатомії, і може бути використана для кількісного визначення експресії імуногістохімічного маркера в будь-якому органі, а також у плаценті, пухлинах для диференційної діагностики.

Найближчим аналогом є спосіб, який передбачає кількісну оцінку експресії імуногістохімічного маркера, здійснювався наступним чином: шматочок тканини пухлини фіксували у 10 % нейтральному формаліні з подальшим проведенням через серію спиртів наростаючої концентрації та заливку у парафін. З парафінових блоків на мікротомі виготовляли зрізи товщиною 4 мкм, зрізи фарбували імуногістохімічно (маркер Ki-67, для оцінки проліферативної активності пухлин). Гістологічні препарати фотографували через мікроскоп за допомогою цифрової фотокамери. Підрахунок результатів здійснювали за допомогою окулярної сітки Автанділова в довільно вибраних полях зору при збільшенні 400 [1, 2]. Оцінку імуногістохімічної мітки виробляли за двома параметрами: ступінь поширення та інтенсивність забарвлення. Ступінь поширення мітки враховували за процентним умістом забарвленої цитоплазми клітин від загального числа клітин у полі зору.

Однак найближчий аналог має недоліки, які полягають в тому, що для визначення поширення експресії імуногістохімічного маркера кількість ядер з експресією підраховувалася за допомогою окулярної сітки власноруч, що є трудомістким процесом та може давати значну похибку.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб кількісного визначення експресії імуногістохімічного маркера шляхом якісної попиксельної детальної візуалізації клітин, які різняться за кольором при їх імуногістохімічному фарбуванні.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі кількісного визначення експресії імуногістохімічного маркера, при якому шматочки плаценти фіксують у 10 % нейтральному формаліні, проводять через серію спиртів наростаючої концентрації, заливають у парафін, виготовляють зрізи тканини товщиною 4 мкм, фотографують через мікроскоп за допомогою цифрової фотокамери, згідно з корисною моделлю, зрізи фарбують імуногістохімічно з використанням моноклональних антитіл проти CD34, отримані фотографії завантажують у форматі JPEG на сервіс ONLINE JPG TOOLS, за допомогою якого визначають колір пікселя у фото та відсоток експресії імуногістохімічного маркера.

Суть корисної моделі пояснюється графічними зображеннями.

Фіг. 1. Фото у форматі JPEG. Мікроскопічний зріз плаценти при антенатальній загибелі плода на 32 тижні вагітності при COVID-19 у матері на 31 тижні гестації. Імуногістохімічне фарбування з використанням моноклональних антитіл проти CD34, $\times 200$. Експресія CD34 у ядрах ендотелію судин ворсин хоріона (стрілки). Наявний темний колір визначає експресію CD34 у ендотелії. В гострому періоді COVID-19 в плаценті виявляється некроз ендотелію, тому експресія в маркера в уражених ядрах відсутня. Просвіт судин звужений.

Фіг. 2. Скріншот ONLINE JPG TOOLS: зліва - завантажене фото, справа - кольори, за якими визначаємо відсоток. Відсоток ядер з експресією маркера CD34-8,54 %.

Фіг. 3. Фото у форматі JPEG. Мікроскопічний зріз плаценти за 2018 рік. Група порівняння. Фарбування імуногістохімічне з використанням моноклональних антитіл проти CD34, $\times 200$. Експресія CD34 (темний колір по периметру судин) виявлялася у всіх ядрах ендотелію судин ворсин хоріона (стрілки).

Фіг. 4. Скріншот ONLINE JPG TOOLS: зліва - завантажене фото, справа - кольори, за якими визначаємо відсоток. Відсоток ядер з експресією CD34-23,84 %.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Шматочки плаценти фіксують у 10 % нейтральному формаліні. Проводять через серію спиртів наростаючої концентрації, заливають у парафін за загально прийнятою методикою, з парафінових блоків на мікротомі Leica SM 2000 R виготовляють зрізи товщиною 4 мкм; зрізи фарбують імуногістохімічно за загальноприйнятою методикою [2, 3]. Мікроскопію проводять за допомогою мікроскопа Olympus BX41 (об'єктив $\times 20$, окуляр $\times 10$). Гістологічні препарати фотографують через мікроскоп за допомогою цифрової фотокамери Olympus SP-500 UZ. Отримані фотографії завантажують у форматі JPEG на сервіс ONLINE JPG TOOLS (onlinejpgtools.com/find-dominant-jpg-colors). За допомогою сервісу ONLINE JPG TOOLS визначають колір пікселя та його відсоток у фото. Зазначають кількість кольорів, відсоток яких потрібно вирахувати - 2 (темний колір у фото - експресія імуногістохімічного маркера, відсутність кольору - відсутність експресії: колір у фото світлий). Відсоток темного кольору у фото є відсотком експресії імуногістохімічного маркера.

Завдяки застосуванню нових дій способу, умов виконання дій забезпечується повне уявлення про відсоток експресії імуногістохімічного маркера.

Приклад виконання способу.

Спосіб кількісного визначення експресії CD-34. Останній є маркером гемопоетичних стовбурових та ендотеліальних клітин, та використовуються для ідентифікації таких клітин. Шматочки плаценти фіксують у 10 % нейтральному формаліні. Проводять через серію спиртів наростаючої концентрації та заливають у парафін за загально прийнятою методикою. З парафінових блоків на мікротомі Leica SM 2000 R виготовляють зрізи товщиною 4 мкм. Зрізи фарбують імуногістохімічно - з використанням моноклональних антитіл проти CD34. Мікроскопію проводять за допомогою мікроскопа Olympus BX41 (об'єктив $\times 20$, окуляр $\times 10$). Гістологічні препарати фотографують через мікроскоп за допомогою цифрової фотокамери Olympus SP-500 UZ. Отримані фотографії завантажують у форматі JPEG на ONLINE JPG TOOLS (onlinejpgtools.com/find-dominant-jpg-colors). Зазначають кількість кольорів - 2, тому що, якщо маркер експресується у ядрі клітини, то колір на фото темний, а якщо ні - то світлий.

Використання даного способу дозволяє визначити відсоток експресії імуногістохімічного маркера за відмінністю кольору пікселя у фото при імуногістохімічному фарбуванні тканини. В такий спосіб може бути кількісно обчислено вираженість експресії будь-якого імуногістохімічного маркера у будь-якому органі, також у плаценті та у пухлинах для диференційної діагностики.

Джерела інформації:

1. Автандилов Г.Г. Fundamentals of quantitative pathological anatomy: монографія / Г.Г. Автандилов. - М.: Медицина, 2002. - 240 с.

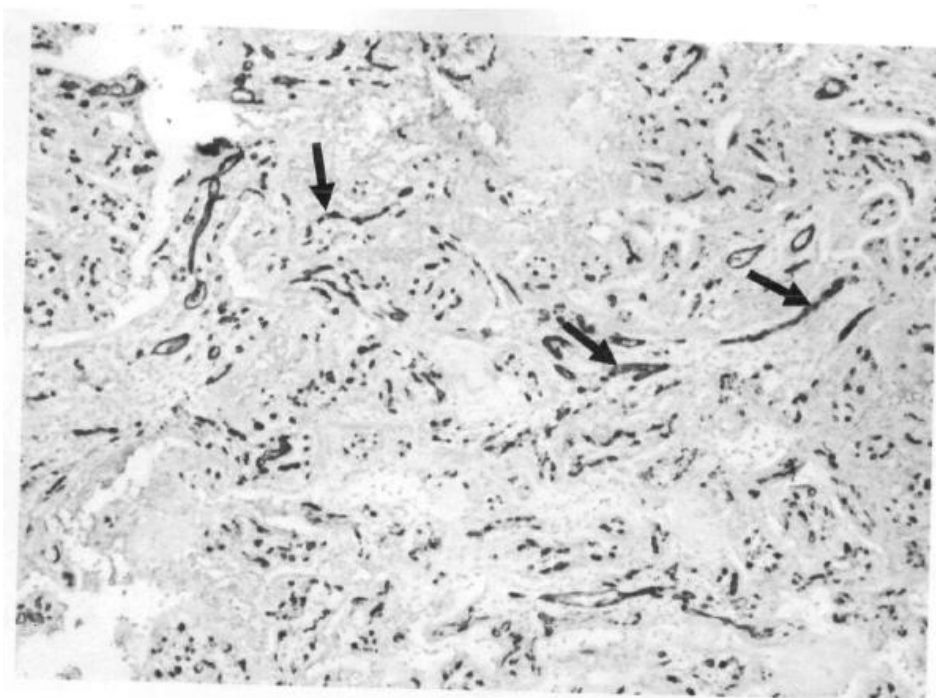
2. Sazonov MYe, Korchahin YeP, Goidenko N1. Immune histochemical study of apoptosis marker expression and proliferation in tissues at follicular neoplasia of the thyroid gland. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY. 2017 Dec27. - 13(8). - 541-5.

3. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. Veterinary Pathology. 2005. - 42(4). - 405-426. doi:10.1354/vp.42-4-405

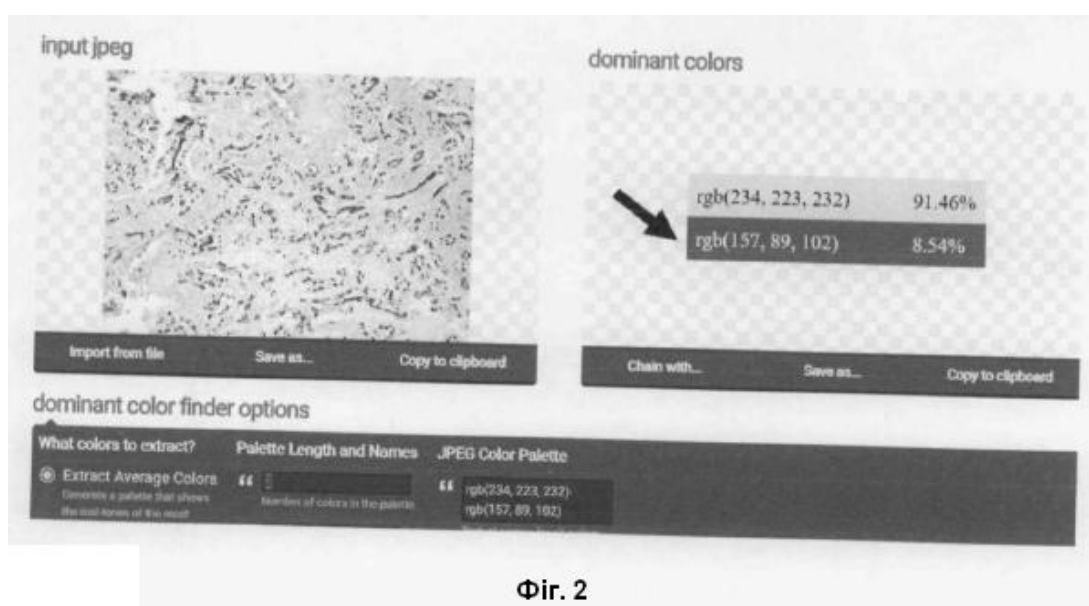
4. Andrii Dinets, Mykola Hulchiy, Anastasios Sofiadis, Mehran Ghaderi, Anders Hoog, Catharina Larsson, Jan Zedenius, Clinical, genetic, and immunohistochemical characterization of 70 Ukrainian adult cases with post-Chornobyl papillary thyroid carcinoma, European Journal of Endocrinology. - Volume 166. - Issue 6, Jun 2012. - Pages 1049-1060, <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0144>.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

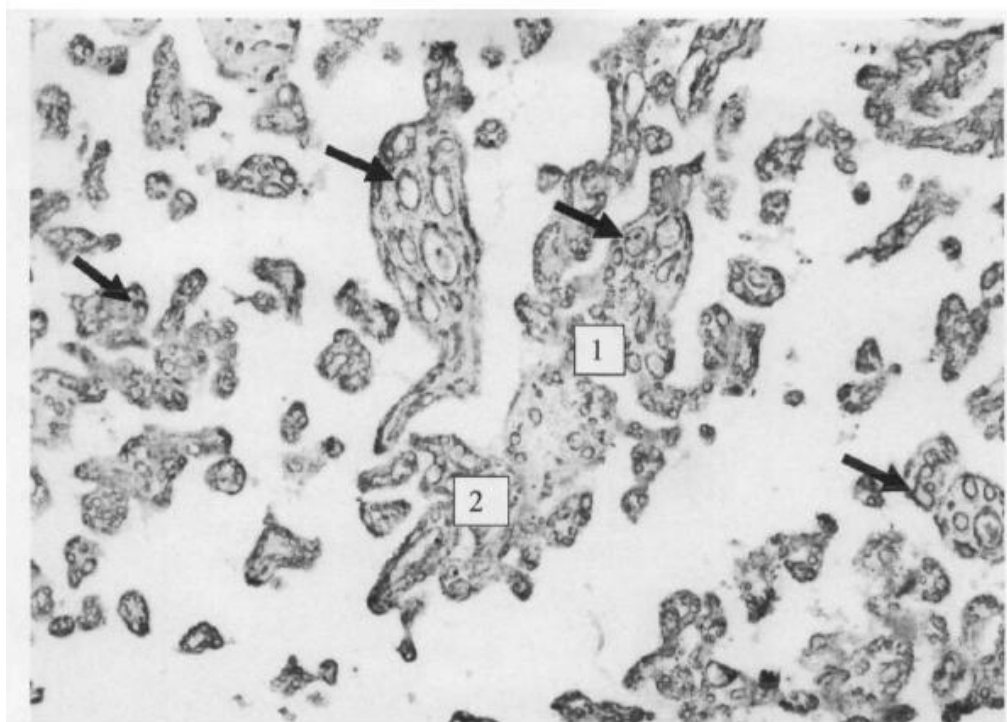
Спосіб кількісного визначення експресії імуногістохімічного маркера, при якому шматочки плаценти фіксують у 10 % нейтральному формаліні, проводять через серію спиртів наростаючої концентрації, заливають у парафін, виготовляють зрізи тканини товщиною 4 мкм, фотографують через мікроскоп за допомогою цифрової фотокамери, який **відрізняється** тим, що зрізи фарбують імуногістохімічно з використанням моноклональних антитіл проти CD34, отримані фотографії завантажують у форматі JPEG на сервіс ONLINE JPG TOOLS, за допомогою якого визначають колір пікселя у фото та відсоток експресії імуногістохімічного маркера.



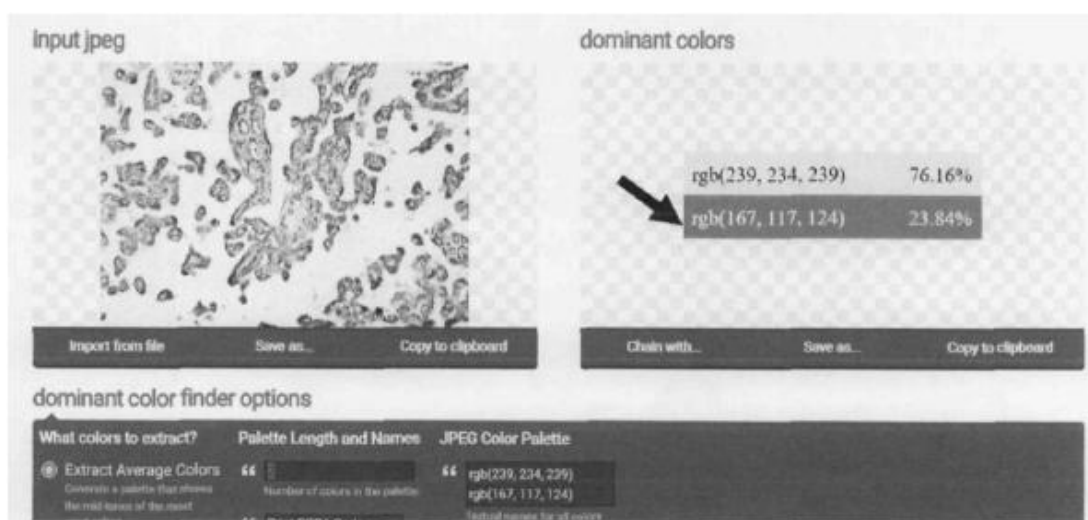
Φir. 1



Φir. 2



Фиг. 3



Фиг. 4