



УКРАЇНА

(19) UA (11) 26436 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/53МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНИХ НОВОУТВОРЕНЬ ОРБІТИ ТА ПРИДАТКІВ ОКА

1

2

(21) u200703408

(22) 29.03.2007

(24) 25.09.2007

(46) 25.09.2007, Бюл. №15, 2007р.

(72) Яковенко Тарас Олександрович

(73) ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ
ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАТОВА(57) Спосіб диференційної діагностики лімфопр-
ліферативних новоутворень орбіти та придатків
ока, що включає проведення клінічного, морфоло-гічного та імуногістохімічного дослідження з вико-
ристанням набору антитіл, який **відрізняється**
тим, що при наявності дрібних лімфатичних клітин
проводять імуногістохімічне дослідження в два
етапи: перший - використання антитіл до антигенів
kappa, lambda, CD3, CD20, при виявленні В-
клітинної лімфоми використовують антитіла до
антигенів CD5, CD23, Cyclin D1, а при виявленні
плазматичних клітин застосовують антитіла лише
до легких ланцюгів kappa і lambda.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до імуноморфологічної діагностики.

Існуючі підходи в проведенні диференційної діагностики лімфопрліферативних новоутворень (ЛПН) орбіти та придатків ока частіше передбачають використання клінічних, морфологічних і імуногістохімічних методів дослідження.

На сьогодні найбільш розповсюдженими методами діагностики ЛПН є морфологічне та імуногістохімічне дослідження [Глузман Д.Ф. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. - К.: Морион, 2003. - 156с.].

На жаль не існує стандартного набору антитіл для проведення імуногістохімічного дослідження [Chan J. Tumors of the lymphoreticular system. Diagnostic histopathology of tumors. Second edition. London etc: Churchill Livingstone, 2000. - 1099p.], крім того не враховується особливості новоутворень лімфоїдного походження орбіти та придатків ока, що потребує використання великої кількості антитіл, а це в свою чергу робить дослідження більш довгим і дорогим.

Відомий спосіб діагностики лімфопрліферативних новоутворень орбіти та придатків ока вирішує цю проблему шляхом проведення морфологічного та імуногістохімічного дослідження з використанням широкого набору антитіл (kappa, lambda, IgM, IgD, pancytokeratin, CD3, CD5, CD20, CD21, CD43, bcl-2, VS38c, p53, ki-67, cyclin D1) [Auw-Haedrich C., Coupland S., et al. Long term outcome of ocular adnexal lymphoma subtyped according to the REAL classification // Br. J.

Ophthalmol. - 2001. - Vol. 85. - P. 63-69.]. Проте цей спосіб має ряд хиб, а саме: дослідження проводиться з обмеженням врахування клінічної картини, морфологічне дослідження направлене тільки на ідентифікацію походження пухлини (без врахування особливостей пухлин лімфоїдного походження), великий набір моноклональних антитіл при проведенні імуногістохімічного дослідження.

Найбільш близьким за суттєвими ознаками (прототипом) є спосіб діагностики лімфопрліферативних новоутворень орбіти та придатків, який зменшує кількість антитіл [Nola M., Lukenda A., M Bollmair., et al. Outcome and Prognostic Factors in Ocular Adnexal Lymphoma // Croat. Med. J. - 2004, - Vol. 45, N 3. - P.328-332.]. Це досягається у використанні клінічних (вік хворого), морфологічних (визначення походження пухлини) досліджень та імуногістохімічного метода з використанням наступних антитіл: CD3, CD5, CD10, CD20, CD23, CD43, bcl-2, bcl-6, CD79a, CD138, cyclin D1.

Цьому способі властиві такі недоліки: морфологічне дослідження обмежується тільки ідентифікацією походження пухлини, однакості дослідження. Використання цілого ряду антитіл є недоцільним:

CD10 - антитіла до антигену, що експресовані на лімфоїдних клітинах попередників (тобто блас-
тних клітинах, не потрібно їх плутати з центробла-
стами та імунобластами), В-клітин зародкового
центру лімфоїдних фолікулів. Антитіла до CD10
антигену потрібно замінити на антитіла до CD23
антигену, який також характерний для фолікуляр-

(13) U

(11) 26436

(19) UA

них лімфом. Крім того нам не потрібно визначати клітини попередники, бо з цією групою клітин, по-перше, ми майже не зустрічаємось, а по-друге, лімфобластний тип лімфом зустрічається виключно у дітей і по-третє, CD23 можна застосовувати на парафінових зрізах, що є суттєвою перевагою.

CD43 - антитіла до антигену, що експресовані на Т-лімфоцитах, NK-клітинах, гістіоцитах. Для визначення Т-лімфоцитів ми і так використовуємо антитіла до CD3 антигена, з NK-клітинами ми не зустрічаємось. Гістіоцити можна встановити при морфологічному дослідженні.

bcl-2 - антитіла до білка супресора апоптоза дає можливість відрізнити пухлинні фолікули від зародкових центрів. Відрізнити доброякісний процес від злоякісного, при чому при всіх клітинних типах лімфом ми можемо використовувати антитіла до наступних антигенів: kappa, lambda CD3, CD20.

bcl-6 - репресор транскрипції. Виявляється при фолікулярних лімфомах, дифузно В-крупноклітинних, лімфомі Беркіта, лімфогранулематозі. Фолікулярну лімфому ми поставимо при наявності CD20 та CD23 антигена. Діагноз дифузну В-крупноклітинну лімфому ми встановлюємо при морфологічному дослідженні, а лімфома Беркіта і лімфогранулематоз, по-перше, мають характерну гістологічну картину, а по-друге, вони не надзвичайно рідко зустрічаються в офтальмоонкології.

CD79a - антиген, що зустрічається на стадії попередників В-лімфоцитів і зберігається до стадії плазматичних клітин. Використовуючи клінічні данні (вік хворого), а також антитіла до CD20 можна відмовитись від антитіл до CD79a антигену. Лімфобластні лімфоми зустрічаються, по-перше, майже виключно у дітей, а по-друге, цей тип клітин можливо встановити при морфологічному дослідженні.

CD138 - маркер плазматичних клітин. Наявність плазматичних клітин ми можемо поставити за даними морфологічного дослідження [Mason D et al. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the Seventh International

Workshop and Conference held in Harrogate, United Kingdom. - Oxford Univ, 2002. - 945p.].

Задачею корисної моделі є підвищення точності диференційної діагностики лімфопроліферативних новоутворень орбіти та придатків ока шляхом застосування етапної методики з використанням клінічного, морфологічного і імуногістохімічного дослідження з оптимальним набором антитіл з урахуванням особливостей новоутворень даної ділянки.

Досягнутий результат полягає в тому, що запропонований спосіб діагностики лімфопроліферативних новоутворень орбіти та придатків ока дозволяє точно без значних фінансових затрат і в ряді випадків швидше встановлювати типи лімфопроліферативних новоутворень, за рахунок врахування вікових особливостей хворих, особливостей лімфоїдних новоутворень орбіти і придатків та поетапного використання оптимального набору антитіл при проведенні імуногістохімічного дослідження.

Вказана задача вирішується тим, що у відомому способі діагностики лімфопроліферативних новоутворень орбіти та придатків ока, що включає клінічне, морфологічне та імуногістохімічне дослідження з використанням набору антитіл, відповідно до корисної моделі, при проведенні морфологічного дослідження додатково визначають розмір клітини та їх будову і при виявленні крупних клітин округлої форми лімфоїдного походження, які в 2-3 рази перевищують розмір лімфоцитів, то одразу діагностують дифузну В-крупноклітинну лімфому, якщо при морфологічному дослідженні виявляють дрібні клітини, проводять імуногістохімічне дослідження з використанням антитіл до антигенів kappa, lambda, CD3, CD20 і при співвідношенні kappa:lambda 3:1 і більше, lambda:kappa 2:1 і більше діагностують плазмоцитому, при всіх інших спів відношеннях - реактивну плазмоцитарну гіперплазію, при цьому якщо в пухлині кількість В- чи Т-лімфоцитів перевищує 70 % відповідно діагностують В- чи Т-клітинну лімфому.

Причинно-наслідкові зв'язки

Причина	Наслідок
При морфологічному дослідженні виявлення крупних клітин округлої форми, що мають лімфоїдне походження і в 2-3 рази перевищують розмір звичайних лімфоцитів	Дозволяє поставити діагноз дифузна-В-крупноклітинна лімфома
При виявленні плазматичних клітин за допомогою морфологічного дослідження, використовуємо антитіла до легких ланцюгів kappa і lambda	Дозволяє поставити діагноз плазмоцитома чи реактивна плазмоцитарна гіперплазія
При виявленні дрібних клітин, що мають лімфоїдне походження, за допомогою морфологічного дослідження, використовуємо антитіла до наступних антигенів: kappa, lambda, CD3, CD20	Дозволяє поставити діагноз реактивна лімфоїдна гіперплазія. В- чи Т-клітинна лімфома
При встановленні за допомогою імуногістохімічного дослідження В-клітинної лімфоми, використовуємо антитіла до наступних антигенів: CD5, CD23, CyclinD1	Дозволяє поставити клітинний тип В-клітинної лімфоми: лімфома маргінальної зони, фолікулярна лімфома, лімфоцитарна лімфома, лімфома із зони мантиї

Запропонована корисна модель дозволяє спростити діагностику, а в ряді випадків, при дифузній В-крупноклітинній лімфомі, значно прискорити постановку діагнозу при збереженні точності і зменшення витрат за рахунок використання клінічних (особливостей вікового перебігу захворювання), морфологічних даних, особливостей ЛПН цієї області і поетапним застосуванням імуногістохімічного дослідження з певним набором антитіл.

Спосіб здійснюють наступним чином: на першому етапі проводять клінічне (встановлення віку хворого) та морфологічного досліджень. Якщо при гістологічному дослідженні виявляють крупні клітини лімфоїдного походження, що нагадують центробласті та/або імунобласти, то діагноз дифузна В-крупноклітинна лімфома виставляють одразу. При виявленні крупних клітин, що нагадують плазмоди, другим етапом проводять імуногістохімічне дослідження з використанням лише антитіл до легких ланцюгів карра та lambda. Залежно від того, в яких співвідношеннях ідентифікують легкі ланцюги карра та lambda встановлюють діагноз плазмодитома чи реактивна плазмодитарна гіперплазія. При плазмодитомах співвідношення карра:lambda=3:1 чи більше, а також lambda:каппа=2:1 чи більше. При всіх інших випадках встановлюють реактивну плазмодитарну гіперплазію. Якщо в гістологічному препараті визначають тканину, що складається з дрібних лімфоцитів, то проводять імуногістохімічне дослідження, використовуючи антитіла до наступних антигенів: карра, lambda CD3, CD20. Це дозволяє визначити реактивну лімфоїдну гіперплазію, а також В- чи Т-клітинну лімфому.

Критеріями постановки діагнозу реактивної лімфоїдної гіперплазії є: співвідношення легких ланцюгів В-лімфоцитів карра:lambda не більше ніж 3:1, а lambda:каппа як 2:1. В середньому, в нормі співвідношення карра:lambda становить 2:1. Кількість Т-клітин становить від 20 до 70%.

Відповідно критеріями постановки діагнозу лімфома були: співвідношення легких ланцюгів В-лімфоцитів карра:lambda більше ніж 3:1, а lambda:каппа як 2:1. Кількість В-лімфоцитів становить більше 80%.

При Т-клітинних лімфомах кількість Т-клітин становить більше 70%.

При визначенні В-клітинної лімфоми використовують додаткові антитіла: CD5, CD23, cyclin D1. В результаті чого визначають лімфому маргінальної зони, лімфому зони мантиї, лімфодитарну та фолікулярну лімфому.

Імунофенотип лімфоми маргінальної зони - CD20+, CD5-, CD23- та cyclin D1-. Імунофенотипичний профіль фолікулярної лімфоми наступний: вона CD20+, CD5-, CD23+ та cyclin D1-. Лімфодитарна лімфома - CD20+, CD5+, CD23+ та cyclin D1-. Лімфома із зони мантиї - CD20+, CD5+, CD23- та cyclin D1+.

Таким чином запропонований спосіб дозволяє більш точно провести диференціальний діагноз,

значно здешевіти дослідження, а також прискорити процес постановки діагнозу.

Приклади конкретного застосування

Приклад 1

Хвора Ф. 49 років, у 2006р. з екзофтальмом правого ока поступила в онкологічне відділення інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова. При проведенні орбітотомії 7.08.06 було взято біопсію для морфологічного дослідження. При морфологічному дослідженні визначаються великі клітини округлої форми (в 2-3 рази більше лімфоцитів). Достатньо помітний ободок цитоплазми з вираженою базофілією оточує світле "пузиреподібне" ядро. Ядра світлі через малу кількість дрібнодисперсного гетерохроматина. Чітко визначаються невеликі ядерця, кількістю від 2 до 4. В даному випадку вже на основі морфологічної картини ми встановили діагноз дифузна В-крупноклітинна лімфома.

Приклад 2

Хвора Ч. 83 роки у 2006р. поступила в онкологічне відділення інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова з новоутворенням кон'юнктиви. Біопсія проводилась 20.09.06. Було проведено морфологічне і імуногістохімічне дослідження. При морфологічному дослідженні визначається тканина, що складається з дрібних клітин із слабо ірегулярним ядром з помірно дисперсним хроматином, помітним ядерцем та вираженою блідою цитоплазмою. Другим етапом була постановка імуногістохімічного дослідження з використанням антитіл до наступних антигенів: карра, lambda CD3, CD20. В результаті ми отримали, що співвідношення карра до lambda становить 1 до 4. Кількість В-лімфоцитів становить 85%, відповідно Т-лімфоцитів - 15%. На цьому етапі ми визначили, що досліджувана пухлина є В-клітиною лімфомою. Наступним етапом є визначення клітинного типу і використовуємо наступні антитіла CD5, CD23, cyclin D1. В результаті проведеного дослідження ми отримали негативну реакцію у всіх випадках. На основі вище перерахованих даних ми встановили діагноз - екстранодальна форма лімфоми маргінальної зони.

Приклад 3

Хвора Ж. 34 роки у 2006р. поступила в онкологічне відділення інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова з новоутворенням кон'юнктиви. Біопсія проводилась 17.10.06. Було проведено морфологічне і імуногістохімічне дослідження. При морфологічному дослідженні визначається тканина, що складається з дрібних клітин із слабо ірегулярним ядром з помірно дисперсним хроматином, помітним ядерцем та вираженою блідою цитоплазмою. При імуногістохімічному дослідженні був визначений наступний імунофенотип: співвідношення легких ланцюгів В-лімфоцитів каппи до лямбди 2:1. Кількість В-лімфоцитів становило 60%, CD5-, CD20+, CD23-, cyclin D1-.

Діагноз: реактивна лімфоїдна гіперплазія кон'юнктиви.

