

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391465** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.11.02

(51) Int. Cl. *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.05.13

(54) **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ АНЕВРИЗМЫ/РАССЛОЕНИЯ
ГРУДНОГО ОТДЕЛА АОРТЫ**

(96) 2023/EA/0022 (BY) 2023.05.13

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
**ВАЛЮЖЕНИЧ ЯРОСЛАВ
ИГОРЕВИЧ; ЮДИНА ОЛЬГА
АНАТОЛЬЕВНА; РУДОЙ АНДРЕЙ
СЕМЕНОВИЧ (BY)**

(57) Изобретение относится к области медицины, к разделу патологической анатомии, и позволяет с помощью компьютерной морфометрии определить этиологию аневризмы расслоения грудного отдела аорты в окрашенном гистологическом образце операционного материала за счет дифференциальной оценки оптической плотности полученного изображения образца, когда при получении числовых показателей средней интенсивности всех пикселей в числовом диапазоне 103,86-176,22 и показателей средней интенсивности, исключая сильноположительные пиксели, в числовом диапазоне 173,54-192,54 - диагностируют наследственный вариант, а при получении результатов, выходящих за указанные диапазоны, судят о дегенеративном этиологическом варианте развития аневризмы расслоения грудного отдела аорты.

202391465
A1

202391465

A1

МПК: G06K9/36
G06K9/62
G01N35/00
G01N21/00
A61B1/00
A61B17/00

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ АНЕВРИЗ- МЫ/РАССЛОЕНИЯ ГРУДНОГО ОТДЕЛА АОРТЫ

Изобретение относится к области медицины, а именно к патологической анатомии и может быть использовано при патогистологическом исследовании у пациентов с аневризмой/расслоением грудного отдела грудной аорты после выполнения оперативного вмешательства, с целью установления этиологии заболевания.

Известен способ стереологических исследований стенки аорты. Способ позволяет оценить площади окрашенных тканей, количество объектов в поле зрения и их характеристики. Стереометрию тканей проводят с учетом размеров площади окрашивания, интегральной яркости (или оптической плотности) изучаемых объектов и их соотношений относительно друг друга [1].

Указанный способ является аналогом по отношению к заявляемому.

Общими признаками для заявляемого способа и аналога является: оценка оптической плотности полученных изображений окрашенных тканей.

Недостатком известного способа является: а) требует применения дополнительных окулярных вставок (окулярная измерительная сетка Автандилова для цитогистостереометрических исследований [1], окулярная вставка Невзорова [1] для анализа микроструктур, обладающих анизотропией); б) низкая скорость оценки материала; в) результаты оценки носят субъективный характер, т.к. напрямую зависят от опыта исследователя; г) характеризуется низкой точностью оценки [1].

Известен способ компьютерного микроскопического исследования, который включает ряд этапов: приготовление цитологического и гистологическо-

го препаратов, настройка микроскопа, исследование препарата, обработка изображения [2].

Указанный способ является прототипом по отношению к заявляемому.

Общими признаками для заявляемого способа и прототипа является: оценка оптической плотности окрашенных тканей.

Однако известный способ не может быть применен из-за низкой эффективности и ряда недостатков: а) низкая скорость оценки материала; б) требует ручного выделения объектов исследования; в) исследователь полагается на субъективный критерий интенсивности красителя; г) невозможность получения воспроизводимых результатов и стандартизированных результирующих параметров, что влияет на точность оценки [2].

Задачей заявляемого изобретения является создание способа определения этиологии развития аневризмы/расслоения грудного отдела аорты, позволяющего повысить точность за счет дифференциальной оценки результирующих параметров, полученных посредством исследования с помощью компьютерной морфометрии окрашенных гистологических препаратов аорт операционного материала.

Поставленная задача достигается следующим образом.

Предложен способ определения этиологии аневризмы расслоения грудного отдела аорты путем исследования с помощью компьютерной морфометрии окрашенных гистологических образцов препаратов аорт операционного материала с учетом оптической плотности полученных изображений или полученного изображения, при этом, при выявлении в полученном изображении с учетом показателей средней интенсивности всех пикселей в числовом диапазоне 163,86-176,22 и пикселей средней интенсивности, исключая сильноположительные пиксели в числовом диапазоне 173,54-192,54 -судят о наследственной этиологии, а при получении показателей оптической плотности превышающих указанные диапазоны, судят о дегенеративной этиологии развития аневризмы грудного отдела аорты.

1. Иммуногистохимическое исследование послеоперационных образцов аорты выполняют с использованием послеоперационных окрашенных диаминбензидином к трансформирующему фактору роста β .
2. Оценку морфометрических показателей в меди аорты осуществляют при помощи компьютерной программы Aperio ImageScope (v12.4.3.5008, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). [3]
3. Оценку результирующих параметров осуществляют в максимально возможном количестве полей зрения по стандартному алгоритму подсчёта позитивных пикселей «Positive Pixel Count v9» с последующим определением следующих показателей: средняя интенсивность всех пикселей (**Iavg**) и средняя интенсивность, исключая сильноположительные пиксели (**Iwavg**) [3].

Заявителями на базе специализированного республиканского медицинского клинического учреждения были проведены исследования 68 гистологических послеоперационных образцов аорты, окрашенных диаминбензидином к трансформирующему фактору роста β . Выполнена морфометрическая оценка в не менее чем 10 полях зрения для каждого образца. Это необходимо для того, чтобы максимально охватить весь объем патологического процесса.

Анализ полученных параметров морфометрического исследования позволил выделить среди результирующих параметров морфометрической оценки два статистически значимых показателя: средняя интенсивность всех пикселей и средняя интенсивность, исключая сильноположительные пиксели. Полученные данные позволили определить диагностические диапазоны, характеризующие этиологию развития аневризмы/расслоения грудного отдела аорты:

Полученные данные позволили создать алгоритм определения этиологии развития аневризмы расслоения грудного отдела аорты в послеоперационном окрашенном гистологическом образце, когда при получении показателей средней интенсивности всех пикселей в диапазоне **163,86-176,22** и средней интенсивности, исключая сильноположительные пиксели в диапазоне **173,54-192,54** судят о наследственной этиологии; а при получении результатов, выходящих за

указанные диапазоны судят о дегенеративной этиологии развития аневризмы/расслоения грудного отдела аорты (границы указанных диапазонов значений показателей вычислены в результате проведенных исследований).

Способ подтверждается примерами конкретного выполнения:

Пример 1. Пациент В 55 лет (установлен диагноз Артериальная гипертензия II степени, риск 4, расслаивающаяся аневризма восходящего отдела аорты), выполнено оперативное вмешательство, получен биопсийный материал.

Для проведения ИГХ-анализа срезы депарафинизируют и гидратируют, блокируют эндогенную пероксидазную активность 3% раствором пероксида водорода в течение 10 мин, демаскируют антигены в цитратном буферном растворе (ab 64236, «Abcam», США) на водяной бане в течение 40 мин [4]. Затем выполняют иммуногистохимическое исследование послеоперационных образцов аорты окрашенных диаминбензидином к трансформирующему фактору роста β [4].

Для морфометрического анализа выполняют сканирование препаратов, окрашенных антителами с использованием цифрового слайд-сканера MoticEasyScan [5]. Для получения количественной оценки результатов ИГХ-реакции микрофотографии с учетом (5-10 репрезентативных полей зрения). Гистологические срезы импортируют в среду компьютерной программы Aperio ImageScope (v12.4.3.5008, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany [3], где оценивают ряд показателей в максимально возможном количестве полей зрения согласно стандартному алгоритму подсчета позитивных пикселей «Positive Pixel Count v9» [3].

На основании проведенного исследования были получены следующие показатели: средняя интенсивность всех пикселей (I_{avg}) –192,20; средняя интенсивность, исключая сильноположительные пиксели (I_{wavg}) – 198,50.

На основании полученных данных судят о дегенеративной этиологии развития аневризмы грудного отдела аорты. Результат подтвержден на основании проведенного контрольного комплексного клинично-инструментального исследования.

Пример 2. Пациент Б. 38 лет установлен диагноз Синдром Марфана, аневризма восходящего отдела аорты, пациенту выполнено оперативное вмешательство. Получены гистологические образцы препаратов послеоперационного материала аорты.

Аналогичным образом, как описано в примере 1, выполняют исследование с помощью компьютерной морфометрии окрашенных гистологических образцов препаратов операционного материала аорты с учетом оптической плотности полученных изображений. Получены следующие числовые показатели:

Средняя интенсивность всех пикселей (I_{avg}) – 168,16; средняя интенсивность, исключая сильноположительные пиксели (I_{wavg}) – 184,14.

В результате проведенных исследований на основании полученных данных установлена наследственная этиология развития аневризмы грудного отдела аорты. В качестве контроля были проведены контрольные генетические исследования, которые подтвердили, что у данного пациента имеется патологическая мутация в гене FBN1.

Таким образом, достигаемый положительный технический результат заявляемого изобретения, заключается в том, что способ дает возможность получить объективную оценку возникновения этиологии заболевания в стенке аорты, на основании которых исследователь имеет сравнительный спектр параметров, которые можно использовать как для сравнительной характеристики изменений сосудистой стенки, так и для выявления корреляционных связей и прогностических факторов. Способ можно широко использовать в лечебной практике для установления причин этиологии заболевания и определить вариант тактики ведения пациентов, а также определить выбор последующих исследований и другой зависимости клинических и лабораторных данных у пациентов для выявления указанной патологии.

Использованная литература:

1. Автандилов Г. Медицинская морфометрия. – Медицина – 1990.- 384 с.

2. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. - М.: Мед.-2002.- 240 с.
3. Leica Microtome Solutions - Leica Biosystems [Electronic resource] – Mode of access:
https://www.leicabiosystems.com/search?search_api_fulltext=Aperio+ImageScope+&sort_by=search_api_relevance&sort_order=DESC&items_per_page=10. – Date of access: 20.03.2022.
4. Abcam: global research support - ELISA [Electronic resource] – Mode of access: <https://www.abcam.com/protocols/elispot-protocol> . – Date of access: 20.03.2022.
5. Patel A. et al. Contemporary whole slide imaging devices and their applications within the modern pathology department: A selected hardware review //Journal of Pathology Informatics. – 2021. – Т. 12. – №. 1. – С. 50.

Формула изобретения

Способ определения этиологии аневризмы расслоения грудного отдела аорты путем исследования с помощью компьютерной морфометрии окрашенных гистологических образцов препаратов аорт операционного материала с учетом оптической плотности полученных изображений или полученного изображения отличающийся тем, что при выявлении в полученном изображении с учетом показателей средней интенсивности всех пикселей в числовом диапазоне 163,86-176,22 и пикселей средней интенсивности, исключая сильно-положительные пиксели в числовом диапазоне 173,54-192,54 -судят о наследственной этиологии, а при получении показателей оптической плотности превышающих указанные диапазоны, судят о дегенеративной этиологии развития аневризмы грудного отдела аорты.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202391465

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61B 10/00 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
A61B 10/00, G01N 33/483

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Espacenet, USPTO, elibrary.ru, Embase, PubMed, Google, Яндекс

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2566714 C2 (ДАКО ДЕНМАРК А/С) 2015-10-27 формула	1
A	БИШТАВИ А.Х. Компьютерная морфометрия: опыт изучения клинической значимости при предраке эндометрия. Журнал ОПУХОЛИ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ, 2014, 1, с. 74-77 весь документ	1
A	СМИРНОВ А. В. Алгоритм компьютерной морфометрии при диагностике патологических изменений нейронов гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании хронической алкогольной интоксикации. ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ, 2021, 1, с. 58-61 весь документ	1
A	ВАЛЮЖЕНИЧ Я.И. Пути оптимизации диагностики и дифференциальной диагностики патологии аорты у пациентов с наследственными нарушениями соединительной ткани. АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АНАТОМИИ В МИРНОЕ И ВОЕННОЕ ВРЕМЯ, сборник научных трудов Всероссийской конференции, посвященной 80-летию Центральной патологоанатомической лаборатории МО РФ ВМедА им. С.М. Кирова. Санкт-Петербург, 2022, 22 апреля, с. 10-12. весь документ	1
A	VERTEMATI M. et al. Histological and immunohistochemical pattern of hepatocellular carcinoma cytokeratin 7-positive and -negative: Comparison by computerized morphometry. ANALYTICAL AND QUANTITATIVE CYTOPATHOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, 2017, 39:4, с. 192-200 весь документ	1

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

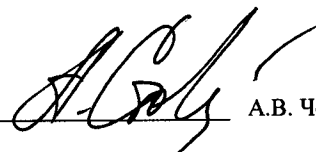
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **01/08/2023**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины


A.V. Чебан