



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2010124816/15**, **11.06.2010**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.06.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **11.06.2010**(45) Опубликовано: **27.12.2011** Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **BERGSON E.J. et al. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2004, V.130, N.1, P.87-91. КОТОВА И.В. Диагностика и хирургическое лечение первичного гиперпаратиреоза. Автореферат диссертации д.м.н. - М., 2004, онлайн [найдено 31.05.2011] [найдено из Интернет] (см. прод.)**

Адрес для переписки:

**193318, Санкт-Петербург, ул. Подвойского,
14, корп.1, кв.741 В.А. Кузнецову**

(72) Автор(ы):

**Слепцов Илья Валерьевич (RU),
Выборнова Нина Борисовна (RU),
Карелина Юлия Валерьевна (RU),
Макарьин Виктор Алексеевич (RU),
Бубнов Александр Николаевич (RU),
Черников Роман Анатольевич (RU),
Федотов Юрий Николаевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное учреждение
"Северо-Западный окружной медицинский
центр Росздрава" (RU)**

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ГИПЕРПАРАТИРЕОЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине. Способ лечения гиперпаратиреоза включает в себя отбор пробы крови пациента перед операцией, отсечением сосудов аденомы околощитовидной железы, удаление аденомы, отбор проб крови через 5 и 10 минут после отсечения сосудистой ножки аденомы определение содержания паратгормона методом иммуноферментного анализа, включающее в себя центрифугирование взятых образцов, культивирование полученного фугата на планшетах, содержащих реагенты для иммуноферментного анализа, прерывание иммунной реакции до достижения фазы ее стабилизации путем промывки лунок с последующим добавлением хромогена, определение оптической плотности растворов, содержащих сыворотку крови пациента, с последующим принятием решения об успешности операции и отсутствии необходимости двусторонней ревизии полости

шеи при снижении оптической плотности раствора, взятого после резекции аденомы по сравнению с пробой, взятой перед операцией, более чем в 2 раза, при этом пробы крови центрифугируют в течение 30-40 с, пробы крови разделяют на несколько частей и помещают в различные лунки планшета, содержащие реагенты для иммуноферментного анализа, прерывание инкубирования и анализ оптической плотности раствора проводят параллельно в трех разных пробах, образующих серию, причем время инкубирования первой серии составляет 5 минут, а длительность инкубирования следующих серий отличается между собой на 1 минуту, а в качестве критерия успешности операции используют относительное снижение оптической плотности растворов, взятых до и после резекции. Результат анализа считается отрицательным при отсутствии снижения оптической плотности растворов, взятых до и после резекции в пробах после 10 минут

культивирования образцов крови. Изобретение обеспечивает снижение травматичности оперативного вмешательства и улучшение его косметического результата при

одновременном сохранении высокого уровня эффективности операции и значительном снижении ее длительности. 1 з.п. ф-лы, 1 ил.

(56) (продолжение):

<www.dissercat.com/.../diagnostika-i-khirurgicheskoe-lechenie-pervichnogo-giperparatireoza>. ПИНСКИЙ С.Б. и др. АСПЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ПЕРВИЧНОГО ГИПЕРПАРАТИРЕОЗА, май 2009, онлайн [найдено 31.05.2011] [найдено из Интернет] <ismu.irkutsk.ru>smg/2009-5/22.pdf>.

R U 2 4 3 8 1 2 9 C 1

R U 2 4 3 8 1 2 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)
A61B 17/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010124816/15, 11.06.2010**

(24) Effective date for property rights:
11.06.2010

Priority:

(22) Date of filing: **11.06.2010**

(45) Date of publication: **27.12.2011 Bull. 36**

Mail address:

**193318, Sankt-Peterburg, ul. Podvojskogo, 14,
korp.1, kv.741 V.A. Kuznetsovu**

(72) Inventor(s):

**Sleptsov Il'ja Valer'evich (RU),
Vybornova Nina Borisovna (RU),
Karelina Julija Valer'evna (RU),
Makar'in Viktor Alekseevich (RU),
Bubnov Aleksandr Nikolaevich (RU),
Chernikov Roman Anatol'evich (RU),
Fedotov Jurij Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie
"Severo-Zapadnyj okružnoy meditsinskij tsentr
Roszdrava" (RU)**

(54) METHOD OF TREATING HYPERPARATHYREOSIS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method of treating hyperparathyreosis involves patient's blood sampling prior to a surgery by excision of parathyroid adenoma vessels, removal of the adenoma, blood sampling in 5 and 10 minutes after excision of an adenoma vascular pedicle, parathyroid hormone ELISA test involving centrifugation of the samples, cultivation of the prepared centrate in plates containing ELISA reagents, ELISA interruption before a stabilisation phase by washing of the and adding chromogen then, evaluation of optical density of the solutions containing patient's blood serum, with considering a successful surgery and stating no need of bilateral neck cavity exploration required in observing the decrease of optical density of the solution sampled after adenoma resection in comparison with a pre-operative sample more than twice; the blood samples are centrifuged for 30-40 sec; the blood samples are

divided into a number of portions and placed in different plate wells containing the ELISA reagents, incubation interruption and optical density analysis of the solution are performed simultaneously in three different samples making a series, and incubation time of the first series makes 5 minutes, and duration of incubation of the following series differs by 1 minute, and a success criterion is a relative decrease of optical density of the pre- and post-operative solutions. The analysis result is considered to be negative in the absence of the decrease of optical density of the pre- and post-operative solutions in the samples 10 minutes after of blood sample cultivation.

EFFECT: decreasing intraoperative injuries and improved cosmetic effect herewith maintaining a high level of operational efficiency and considerably reduced operation length.

2 cl, 1 ex

Изобретение относится к области медицины, точнее к способам лечения патологии околощитовидных желез, а именно гиперпаратиреоза.

В настоящее время наиболее широко распространенным методом лечения гиперпаратиреоза, связанного с формированием у пациента аденом околощитовидных желез, является двусторонняя хирургическая ревизия полости шеи с визуальным определением состояния околощитовидных желез, выявлением аденоматозно измененной околощитовидной железы и ее удалением. Данный способ является высокоэффективным и приводит в большинстве (до 92,8%) случаев к нормализации уровня паратгормона после операции и восстановлению нормальных параметров фосфорно-кальциевого обмена [Russel C.F., Edis A.J. Br. J. Surg., 1982. - V.69. - P.244-247].

Однако двусторонняя ревизия полости шеи является достаточно травматичным вмешательством, проводящимся через разрез кожи длиной 7-8 см, и сопровождается повреждением тканей шеи с обеих сторон с последующим формированием рубцового процесса в зоне операции. Кроме того, при его использовании наблюдается повышенная вероятность развития послеоперационного гипопаратиреоза [Tibblin S., Bondeson A.G., Ljungberg O. Ann. Surg. 1982. - V.195. - P.245-252].

Известен способ лечения гиперпаратиреоза, заключающийся в проведении односторонней ревизии полости шеи с визуальным определением состояния околощитовидных желез только с одной стороны (справа или слева) [Roth S.I., Wang C.A, Potts J.T. Hum. Pathol. 1975. - V.6. - P.645-648]. Определение стороны тела, с которой проводится ревизия околощитовидных желез, производится на основании данных предоперационного обследования, включающего в себя ультразвуковое обследование и субтракционную сцинтиграфию с технетрилом. Подобное оперативное вмешательство позволяет добиться излечения гиперпаратиреоза в 88,8% случаев, при одновременном уменьшении травматичности вмешательства по сравнению с двусторонней ревизией полости шеи [Bergenfelz A. et al. Ann. Surg. 2002. - V.236. - P.543-551].

Вместе с тем, косметический эффект односторонней ревизии полости шеи аналогичен эффекту двусторонней ревизии. Кроме того, вероятность персистирования гиперпаратиреоза после односторонней ревизии превышает такую вероятность после двусторонней ревизии, поскольку визуально осматриваются не все околощитовидные железы, в результате чего сохраняется возможность наличия в организме пациента второй, не выявленной на диагностическом этапе, аденомы. Частота встречаемости двойных аденом околощитовидных желез составляет до 15%, т.е. является достаточно высокой [Siperstein A. et al. Surgery. 2004. - V.136. - P.872-880].

Известен способ лечения гиперпаратиреоза, заключающийся в селективной паратиреоидэктомии, т.е. удалении аденомы околощитовидной железы без ревизии остальных околощитовидных желез [Udelsman R. Ann. Surg. 2002. - V.235. - P.665-670]. Локализация пораженной околощитовидной железы определяется по результатам ультразвукового исследования и сцинтиграфии околощитовидных желез, а удаление аденомы производится через разрез небольшого размера (2-5 см), что улучшает косметический результат операции и снижает выраженность послеоперационных болевых ощущений. Вместе с тем, при этом сохраняется вероятность персистирования гиперпаратиреоза после операции, связанная с возможным наличием в организме второй аденомы околощитовидной железы.

Наиболее близким по технической сущности к заявляемому является способ селективной паратиреоидэктомии, в котором отсутствие второй аденомы

контролируется по изменению уровня паратгормона в сыворотке крови через 5 или 10 минут после удаления аденомы [Bergson E.J. et al. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2004. - V.130. - N.1. - P.87-91]. Измерение уровня гормона осуществляют методом иммуноферментного анализа, включающего в себя центрифугирование образца крови в течение 5 минут, помещение полученной сыворотки крови в лунки планшета, содержащего фиксированные к твердой фазе антитела к паратгормону и конъюгат «антитело-фермент», инкубирование в течение 30 минут. Затем лунки планшета промывают, удаляя несвязавшуюся часть конъюгата, вносят раствор субстрата (хромогена), измеряют оптическую плотность пробы и определяют, сопоставляя с калибровочной кривой, количество паратгормона в пробе в пг/мл или пмоль/л. При этом падение уровня паратгормона в сыворотке крови более чем на 50% от исходного предоперационного уровня считается доказательством отсутствия дополнительных аденом околощитовидных желез у пациента, что позволяет хирургу не проводить двустороннюю ревизию полости шеи с целью определения состояния остальных околощитовидных желез.

Недостатком способа является длительность лабораторного анализа - не менее 40 мин, из которых 5 минут затрачивается на центрифугирование образца крови, 30 минут - на инкубирование (через 30 мин осуществляется стабилизация количества образовавшихся комплексов антитело-антиген-антитело-фермент), 5 минут - на отмывку образца, добавление раствора хромогена, чтение результатов исследования, сравнение результата с калибровочной кривой и выдачу результата в выбранных единицах измерения. В итоге возникает необходимость длительного ожидания результатов лабораторного исследования в ходе операции, что значительно удлиняет ее протяженность.

Технической задачей, на решение которой направлено данное изобретение, является сокращение времени оперирования пациентов с первичным гиперпаратиреозом путем проведения селективной паратиреоидэктомии с интраоперационным определением динамики изменения уровня паратгормона крови.

В основу решения задачи была положена проблема поиска такого режима обработки крови, который позволял бы получать данные об отсутствии дополнительных аденом околощитовидных желез в более короткие сроки. В ходе проведения экспериментов было установлено, что технический результат может быть достигнут при проведении центрифугирования в течение 30-40 с проб крови, взятых за 1 минуту до отсечения сосудов аденомы околощитовидной железы, и через 5 и 10 минут после отсечения сосудов аденомы с последующим одновременным культивированием каждой из проб на нескольких лунках планшета и одновременным прерыванием иммунной реакции через каждую 1 минуту - начиная с 5 минуты в трех разных пробах, образующих серию, на различных сроках инкубации путем промывки лунок с последующим добавлением хромогена и измерением оптической плотности полученных растворов, причем при регистрации снижения оптической плотности раствора, полученного при обработке проб крови, взятых после отсечения сосудов аденомы, более чем в 2 раза по сравнению с раствором, полученным при обработке пробы, взятой непосредственно перед отсечением сосудов аденомы, тест считается положительным, и двусторонняя ревизия полости шеи не проводится. Как правило, исследование проводится до 10 минуты культивирования включительно. Отсутствие заданного результата в течение 10 минут культивирования рассматривается как указание на наличие второй аденомы.

Лабораторное исследование всех трех проб крови производится одновременно, что

позволяет не использовать при анализе результатов стандартную калибровочную кривую анализатора, поскольку калибровка анализатора при исследовании всех трех образцов крови является одинаковой, и дополнительно сократить время получения результата, а также задействовать автоматизированные системы анализа проб.

5 Предлагаемая методика позволяет заменить расчет уровня паратгормона в крови в абсолютных величинах на сравнение между собой только оптической плотности соответствующих растворов. Так как с самого начала этапа инкубирования кривые связывания иммунных компонентов (антител, молекул гормона, комплексов «антител-фермент») в растворах, содержащих плазму крови пациента до отсечения сосудов аденомы и через 5 и 10 минут после отсечения сосудов, проходят с выраженным смещением друг от друга, то различие в оптической плотности после добавления хромогена фиксируется достаточно надежно уже на ранних сроках инкубирования. В 10 большинстве случаев падение оптической плотности в 2 раза выявляется уже через 4-5 минут инкубации, в связи с чем результат теста может быть получен значительно 15 раньше, чем будет достигнута фаза стабилизации (30 минут).

На чертеже показаны различия в кривых изменения оптической плотности растворов, полученных при обработке плазмы крови пациента, взятой до удаления аденомы (верхняя кривая) и через 5 минут после ее удаления (нижняя кривая). В 20 качестве примера выделены результаты измерения относительной плотности растворов, выраженной в относительных световых единицах (RLU), между исследуемыми образцами на сроке инкубации 4 минуты.

25 Сущность и преимущества заявляемого способа, а также промышленная применимость изобретения иллюстрируются следующими примерами.

Пример 1. В клинике ФГУ СЗОМЦ Росздрава в период с сентября 2010 по февраль 2010 года находилось на лечении 35 пациентов с диагнозом «Первичный гиперпаратиреоз». У всех пациентов локализация аденомы околощитовидной железы 30 была определена до операции путем использования ультразвукового исследования и субтракционной сцинтиграфии с технетрилом.

Пациентам было проведено оперативное вмешательство в объеме селективной паратиреоидэктомии (в 20 случаях - традиционным способом, в 15 случаях - путем использования видеоассистированной методики удаления аденомы). Размер кожного 35 разреза колебался в диапазоне от 1,5-2 см при видеоассистированном способе оперирования до 3-3,5 см при традиционном вмешательстве.

В 33 случаях использование данных предоперационного обследования позволило локализовать аденому околощитовидной железы в операционной ране. После 40 мобилизации аденомы, за 1 минуту до пересечения сосудов аденомы, проводили взятие пробы венозной крови пациента, после чего ножку аденомы клипировали и пересекали. Через 5 и 10 минут после клипирования и пересечения сосудистой ножки аденомы проводили взятие проб венозной крови, после чего все три пробы одновременно помещали в центрифугу и центрифугировали в течение 30 секунд при 45 скорости вращения 3000 оборотов в минуту.

Через 30 секунд из каждой пробирки отбирали часть сыворотки крови, которую переносили в лунки планшета для иммуноферментного анализа и помещали в иммуноферментный анализатор. Инкубирование проб крови со стандартными 50 реагентами для иммуноферментного анализа (время достижения фазы стабилизации иммуноферментной реакции для использованного набора реактивов - 30 минут) проводили при комнатной температуре одновременно в нескольких лунках планшета. Иммунную реакцию прерывали сразу в трех пробах одновременно через 2, 3, 4, 5, 7,

8, 9, 10 минут путем промывки соответствующих лунок планшета с последующим добавлением раствора хромогена. Проводили анализ оптической плотности полученных растворов, выраженной в относительных световых единицах (RLU, Relative Light Unit). На основании результатов данного анализа принимали решение о необходимости проведения двусторонней ревизии полости шеи или прекращении операции. При падении оптической плотности более чем в 2 раза в пробах, полученных через 5 или 10 минут после удаления аденомы, по сравнению с пробой, полученной до удаления аденомы, результат теста считали положительным, в связи с чем операцию прекращали и накладывали швы на рану. При отсутствии динамики падения уровня оптической плотности или при нарастании ее проводили двустороннюю ревизию полости шеи.

Пробирку с оставшейся частью крови и осевшими на дно форменными элементами продолжали центрифугировать в течение 4,5 минут, после чего забирали из пробирки сыворотку. Данную часть сыворотки крови помещали в иммуноферментный анализатор и инкубировали по стандартной схеме (инкубация 30 минут, промывка, добавление хромогена, чтение результатов, вычисление абсолютных значений уровня паратгормона в пмоль/л путем сравнения со стандартной калибровочной кривой).

В 17 случаях у пациентов отмечалось падение уровня оптической плотности растворов, полученных при обработке проб крови, взятых через 5 и 10 минут после удаления аденомы, в 2 раза по сравнению с оптической плотностью раствора, полученного при обработке сыворотки крови пациента, взятой до отсечения сосудов аденомы, при времени инкубирования в 4 минуты, в 3 случаях - при времени инкубирования в 5 минут, в 3 случаях - при времени инкубирования в 7 минут, в 7 случаях - при времени инкубирования 8 минут, в 2 случаях - при времени инкубирования в 10 минут. Подобный результат расценивался как свидетельствующий об отсутствии второй аденомы околощитовидной железы у пациента, в связи с чем оперативное вмешательство ограничивалось селективной паратиреоидэктомией, и двусторонняя ревизия полости шеи не проводилась. У всех пациентов данной группы через 2 месяца после операции сохранялся нормальный уровень паратгормона и ионизированного кальция крови, что свидетельствовало о выздоровлении. При этом среднее время инкубирования образца крови до получения диагностического ответа теста составило 5,14 минуты.

В 2 случаях после удаления объемного образования, выявленного в зоне ожидаемого расположения аденомы, падение уровня оптической плотности растворов, полученных при обработке крови пациента, взятой через 5 и 10 минут после удаления аденомы, составило лишь 10% от исходного через 10 минут инкубации, а в 1 случае отмечалось нарастание уровня оптической плотности. В этих случаях проводилась двусторонняя ревизия полости шеи. В 2 случаях после ревизии полости шеи была выявлена аденома околощитовидной железы, располагавшаяся вблизи места первоначальной ревизии, но не удаленная хирургом (участок ткани, удаленный при первоначальной ревизии, при последующем гистологическом исследовании был признан лимфатическим узлом), а в 1 случае выявлена вторая аденома околощитовидной железы, расположенная на противоположной стороне шеи. После удаления аденом путем двусторонней ревизии падение уровня оптической плотности соответствовало диагностическому: у всех пациентов оптическая плотность растворов, полученных при обработке крови пациента, взятой через 5 и 10 минут после удаления аденомы, при культивировании в течение 5 минут снизилась в 4 раза. У всех пациентов, перенесших двустороннюю ревизию полости шеи, через 2 месяца после

операции сохранялся нормальный уровень паратгормона и ионизированного кальция крови, что свидетельствовало о выздоровлении.

Изучение результатов исследования паратгормона крови, выраженного в абсолютных цифрах, показало аналогичные результаты. Ни в одном случае не отмечалось расхождений между динамикой снижения уровня оптической плотности и динамикой снижения уровня паратгормона крови. Вместе с тем, оценка абсолютного уровня паратгормона была возможна лишь через 30-40 минут после взятия пробы.

Таким образом, заявляемый способ позволяет значительно сократить время анализа при одновременном сохранении высокого уровня эффективности операции, повысить точность определения динамики снижения оптической плотности при помощи одновременного лабораторного анализа всех трех проб крови, что позволяет проводить исследование в максимально сходных между собой условиях и одинаковом состоянии калибровки прибора.

Модифицированный способ лечения позволяет добиться снижения травматичности оперативного вмешательства и улучшения его косметического результата при значительном снижении ее длительности по сравнению с прототипом; снизить вероятность персистенции гиперпаратиреоза после оперативного лечения.

Формула изобретения

1. Способ лечения гиперпаратиреоза, включающий в себя отбор пробы крови пациента перед операцией, отсечение сосудов аденомы околощитовидной железы, удаление аденомы, отбор проб крови через 5 и 10 мин после отсечения сосудистой ножки аденомы, определение содержания паратгормона методом иммуноферментного анализа, включающее в себя центрифугирование взятых образцов, культивирование полученного фугата на планшетах, содержащих реагенты для иммуноферментного анализа, прерывание иммунной реакции до достижения фазы ее стабилизации путем промывки лунок с последующим добавлением хромогена, определение оптической плотности растворов, содержащих сыворотку крови пациента, с последующим принятием решения об успешности операции и отсутствии необходимости двусторонней ревизии полости шеи при снижении оптической плотности раствора, взятого после резекции аденомы по сравнению с пробой, взятой перед операцией более чем в 2 раза, отличающийся тем, что пробы крови центрифугируют в течении 30-40 с, пробы крови разделяют на несколько частей и помещают в различные лунки планшета, содержащих реагенты для иммуноферментного анализа, прерывание инкубирования и анализ оптической плотности раствора проводят параллельно в трех разных пробах, образующих серию, причем время инкубирования первой серии составляет 5 мин, а длительность инкубирования следующих серий отличается между собой на 1 мин, а в качестве критерия успешности операции используют относительное снижение оптической плотности растворов, взятых до и после резекции.

2. Способ по п.1, отличающийся с тем, что результат анализа считается отрицательным при отсутствии снижения оптической плотности растворов, взятых до и после резекции в пробах после 10 мин культивирования образцов крови.

