



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **40851** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61C 17/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ В ДІЛЯНЦІ ПЕРЕХІДНОЇ СКЛАДКИ ПРИСІНКУ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ

1

(21) u200813960

(22) 04.12.2008

(24) 27.04.2009

(46) 27.04.2009, Бюл. № 8, 2009 р.

(72) ТКАЧЕНКО ПАВЛО ІВАНОВИЧ, UA, КАЙДАШЕВ ІГОР ПЕТРОВИЧ, UA, СІДАШ ЮЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, UA, МИТЧЕНКО МАРІЯ ПЕТРІВНА, UA, ЛОБАЧ ЮРІЙ БОРИСОВИЧ, UA, МЯКУШКО АНДРІЙ ВАЛЕРІЙОВИЧ, UA

(73) ТКАЧЕНКО ПАВЛО ІВАНОВИЧ, UA, КАЙДАШЕВ ІГОР ПЕТРОВИЧ, UA, СІДАШ ЮЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, UA, МИТЧЕНКО МАРІЯ ПЕТРІВНА, UA, ЛОБАЧ ЮРІЙ БОРИСОВИЧ, UA, МЯКУШКО АНДРІЙ ВАЛЕРІЙОВИЧ, UA

2

(57) Спосіб оцінки стану клітинного імунітету периферійної крові слизової оболонки в ділянці перехідної складки присінку ротової порожнини, що включає забір периферійної крові, приготування з цільної крові лейкоконцентрату, визначення субпопуляції Т-лімфоцитів, який **відрізняється** тим, що забір крові проводиться в ділянці перехідної складки або в ділянці, що прилягає до вогнища запалення як одонтогенного, так і неодонтогенного походження, а як моноклональні антитіла для визначення Т-лімфоцитів використовують антитіла CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ та додатково CD25⁺; HLA-DR.

Запропонована корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до стоматології. Вона може бути використана для оцінки стану клітинного імунітету периферійної крові слизової оболонки в ділянці перехідної складки присінку ротової порожнини практично здорових осіб, хворих з одонтогенними запальними процесами, захворюваннями тканин пародонта та слизової оболонки для уточнення і обґрунтування діагнозу та вибору методу лікування.

Відомі способи оцінки клітинного імунітету периферійної крові слизової оболонки порожнини рота шляхом визначення фенотипу внутрішньоепітеліальних лімфоцитів слизової оболонки порожнини рота за допомогою маркерів CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD16⁺, CD14⁺ (CD - cluster of differentiation - кластер диференціювання) (Пат. UA 48519A UA, МПК А61 С 17/00. Спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота / Кайдашев І.П., Ткаченко П.І., Куроедова В.Д., Карасюнок О.О., Шинкевич В.І., Баштовенко О.А. - № 2001096503; заявл. 24.09.2001; опубл. 15.08.2002, бюл. № 8. - С. 4.37.); визначення фенотипу лімфоцитів периферичної крові пародонта за допомогою маркерів CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD56⁺ (Максимовський Ю.М., Чиркова Т.Д., Ульянова М.А. Особенности клеточного иммунитета при катаральном гингивите. Сообщение 2. // Стоматология. - 2003. - № 4. - С. 29-31).

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб оцінки клітинного імунітету зубощелепного сегменту за експресією маркерів CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD20⁺ (Пат. 8771 Україна, МПК А 61 С 17/00 / Спосіб оцінки клітинного імунітету зубощелепного сегмента / Ткаченко П. І., Кайдашев І.П., Гоголь А.М. - № 200501666; заявл. 23.02.2005; опубл. 15.08.2005, бюл. № 8.).

Суть його полягає в тому, що проводиться забір ясеневі крові в пробірку мікропіпеткою по 500 мкл. Клітинний імунітет досліджується за допомогою непрямого імунофлуоресцентного методу із застосуванням первинних моноклональних антитіл CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD20⁺. Для виявлення комплексу антиген+антитіло (АГ+АТ) використовувались мічені флуорецінізотіоціанатом антитіла (FITC).

Однак, недоліком даного способу є неповна об'єктивна інформативність щодо визначення імунокомпетентних клітин, які беруть участь у розвитку, перебігу одонтогенного запалення та пошкодження слизової оболонки порожнини рота, що зумовлено наступними обставинами. Забір крові в ділянці зубощелепного сегмента проводиться із лунки видаленого зуба, що не може в повній мірі виключити вплив прихованого та явного запалення в периапікальних тканинах на показники імуніграми. Тому дані обставини не дозволяють дати об'єктивну оцінку клітинного імунітету периферій-

(13) **U**
(11) **40851**
(19) **UA**

ної крові порожнини рота (Ткаченко П.І., Гоголь А.М. Показники клітинного імунітету зубощелепного сегмента тимчасових зубів при фізіологічній зміні // Матер. міжнар. наук.-практ. конф. "Сучасні технології щелепно-лицевої і хірургічної стоматології". - Івано-Франківськ, 2005. - С. 94.).

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб оцінки клітинного імунітету периферійної крові слизової оболонки в ділянці перехідної складки присінку ротової порожнини шляхом удосконалення відомого способу, який дозволив би об'єктивно судити про рівень імунних реакцій, які відбуваються в тканинах ротової порожнини, що безпосередньо прилягають до вогнища запалення та досягти об'єктивізації інформації щодо стану субпопуляцій лімфоцитів, які беруть участь в цих реакціях.

Поставлена задача вирішується шляхом розробки способу оцінки стану клітинного імунітету периферійної крові слизової оболонки в ділянці перехідної складки присінку ротової порожнини, що включає забір периферійної крові, приготування з цільної крові лейкоконцентрату, визначення субпопуляції Т-лімфоцитів, який, згідно корисної моделі, відрізняється тим, що забір крові проводиться в ділянці перехідної складки, або в ділянці, що прилягає до вогнища запалення як одонтогенного, так і неодонтогенного походження, а в якості моноклональних антитіл для визначення Т-лімфоцитів використовують антитіла CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ та додатково CD25⁺; HLA-DR.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином:

1. Визначається місце забору матеріалу з урахуванням місця розташування уражених тимчасових чи постійних зубів, або ж сегменту ясен, слизової оболонки, що «скомпроментовані».

2. Після визначення ділянки, ураженої патологічним процесом і ізоляції її від ротової рідини ватними тампонами та висушуванням місця вколу, виконується скарифікація перехідної складки чи визначеної ділянки ясен і за допомогою мікропіпетки проводиться забір периферійної крові для дослідження (500 мкл в об'ємі).

3. В охолоджену до - 5°C пробірку, що вміщує гепарин (з розрахунку 25 ОД на 1 мл крові), додається зібрана кров.

4. Після лізису еритроцитів готується лейкоконцентрат.

5. Проводиться інкубація клітин з моноклональними антитілами (МКАТ) до CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD25⁺, HLA-DR. Для їх візуалізації проводиться наступна інкубація з FITC-кон'югованими козячими антитілами до мишиних імуноглобулінів.

6. За допомогою проточного цитофлюориметра „COULTER EPICS XL-MC" проводиться аналіз відсоткового вмісту субпопуляцій Т-клітинних рецепторів лімфоцитів.

Приклад використання 1.

Проведено дослідження периферійної крові слизової оболонки в ділянці перехідної складки присінку ротової порожнини у практично здорових людей за допомогою непрямого імунофлуоресцентного методу. В якості первинних моноклональних антитіл використовували CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD25⁺, HLA-DR-мишачі антитіла. Для виявлення комплексу АГ+АТ використовували FITC-мічені антитіла. Отримані результати, в загальних рисах, показали нормальну кількість активованих Т-лімфоцитів.

Приклад використання 2.

Проведено дослідження периферійної крові слизової оболонки в ділянці перехідної складки присінку ротової порожнини при хронічному періодонтиті. У даної групи пацієнтів спостерігалось збільшення кількості Т-лімфоцитів з маркерами CD3⁺, CD4⁺, незначне зменшення з маркерами CD8⁺, CD4⁺ та незначне збільшення з маркерами CD16⁺ і CD25⁺.

Отримані результати досліджень, проведених запропонованим методом, дозволяють зробити висновок про високу інформативність аналізу клітинного імунітету периферійної крові слизової оболонки в ділянці перехідної складки присінку ротової, який дозволяє об'єктивно оцінити роль імунних механізмів у патогенезі одонтогенних запальних процесів щелепно-лицевої ділянки та захворювань тканин пародонта.