



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **18110** (13) **U**
(51) **МПК (2006)**
A61B 17/24

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ УСКОПЛЕНЬ ПІСЛЯ ХІРУРГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ МІЛКОГО ПРИСІНКУ ПОРОЖНИНИ РОТА

1

2

(21) u200605817

(22) 26.05.2006

(24) 16.10.2006

(46) 16.10.2006, Бюл. № 10, 2006 р.

(72) Баунова Інна Володимирівна, Кайдашев Ігор Петрович, Куроедова Віра Дмитрівна

(73) Баунова Інна Володимирівна, Кайдашев Ігор Петрович, Куроедова Віра Дмитрівна

(57) Спосіб прогнозування ускладнень після хірургічної корекції мілкового присінку, що включає проведення комплексу клініко-діагностичних досліджень, забір досліджуваного матеріалу та його обробку, який **відрізняється** тим, що як досліджуваний матеріал використовують біоптат слизової оболонки в області прикріпленої частини ясен і здійснюють вивчення морфологічної та ультраструктурної

організації фіброblastів підслизового шару ясен з використанням імуногістохімічних та гістологічних досліджень, імуногістохімічне дослідження фіброblastів, проводять із використанням клітинної суспензії біоптату за допомогою реакції моноклональних мишачих антитіл до фіброblastів людини (Dako Cytomation, США), гістологічне дослідження виконують після забарвлення зрізів гематоксилін-зозином та по Маллорі з наступним підрахуванням кількості фіброblastів з урахуванням ступеня глибини присінку порожнини рота і визначають ступінь проліферативної активності фіброblastів, при підвищеному ступені проліферативної активності фіброblastів у досліджуваному матеріалі прогнозують можливість ускладнення, а саме утворення рубцевої деформації після хірургічного втручання.

Запропонований спосіб відноситься к галузі медицини, а саме до стоматології, до ортодонції.

Відомий спосіб прогнозування ускладнень ортодонтичного лікування [Пат.№22004, А61С7/00.Спосіб прогнозування ускладнень ортодонтичного лікування /Куроедова В.Д., Седих К.В. (ТІА).-Заявка №96051928;Заявл. 17.05.1996; Опубл. 30.04.1998 Бюл. №2/1998].

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб прогнозування ускладнень при хірургічних втручаннях [Пат.№63714, А6ІВ 10/00. Спосіб прогнозування ускладнень при хірургічних втручаннях / Тумасова К. П., Гомоляко І. В., Чернуха Л.М., Інститут хірургії та трансплантології АМН України .- Заявка№2003065080 , Заявл. 03.06.2003; Опубл. 15.01.2004 Бюл. № 1/2004] Спосіб включає проведення комплексу клініко-діагностичних досліджень, забір досліджуваного матеріалу та його обробку, в якості досліджуваного матеріалу використовували кров і проводили морфометричне дослідження мазку крові. При цьому при морфометричному дослідженні мазку крові вимірюють площу нейтрофільних гранулоцитів крові і яскравість цитоплазми і при збільшенні клітин, що мають площу більше ніж 170 мкм² та яскравість цитоплазми

більше ніж 190 ум.од. прогнозують розвиток гнійних ускладнень.

Однак відомий спосіб недостатньо ефективний при прогнозуванні розвитку ускладнень після хірургічної корекції мілкового присінку порожнини рота внаслідок недостатньої його інформативності.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб прогнозування ускладнень після хірургічної корекції мілкового присінку, шляхом удосконалення відомого, за рахунок дослідження морфологічної та

ультраструктурної організації підслизового шару ясен, досягти підвищення інформативності способу та забезпечити підвищення ступеню достовірності прогнозування.

Поставлене завдання вирішують створенням способу прогнозування ускладнень після хірургічної корекції мілкового присінку, що включає проведення комплексу клініко-діагностичних досліджень, забір досліджуваного матеріалу та його обробку який, згідно винаходу, відрізняється тим, що в якості досліджуваного матеріалу використовують біоптат слизової оболонки в області прикріпленої частини ясен і здійснюють вивчення морфологіч-

(19) **UA** (11) **18110** (13) **U**

ної та ультраструктурної організації фібробластів підслизового шару ясен шляхом проведення їх імуногістохімічних та гістологічних досліджень, імуногістохімічне дослідження фібробластів, виконують після виготовлення з біоптату клітинної суспензії, за допомогою реакції моноклональних мишачих антитіл до фібробластів людини (Dako Cytomation, США), гістологічне дослідження виконують після забарвлення зрізів гематоксилін-езином та по Маллорі з наступним підрахуванням кількості фібробластів з урахуванням ступеню глибини присінку порожнини рота і проводять визначення ступеню проліферативної активності фібробластів, при підвищеному ступені проліферативної активності фібробластів у досліджуваному матеріалі, прогнозують можливість ускладнення, а саме, утворення рубцевої деформації після хірургічного втручання.

Запропонований спосіб прогнозування ускладнень після хірургічної корекції мілкого присінку здійснюють наступним чином. Після проведення комплексу клініко-діагностичних досліджень, виконують забір досліджуваного матеріалу. Матеріал для дослідження одержують шляхом біопсії слизової оболонки в області прикріпленої частини ясен, після проведення інфільтраційної анестезії. Розмір біоптата 1,5х 1,5 мм. Біопсія проводиться поза зоною прикріплення вуздечки нижньої губи, відступаючи

від неї на 3 мм вправо. Потім біоптант розміщують у пробірку з фіз. розчином.

Для імуногістохімічного дослідження частину одержаного біоптанта розміщують у культуральний флакон з поживним середовищем яке складається із розчину Ігла (90мл), сироватки крупного рогатого скота (5мл), пуповидної сироватки людини (5мл), глютаміну (30мл), канаміцину (40мл). (строк зберігання 3-4 діб при $t + 4^{\circ}\text{C}$). Потім біоптат переміщують у стерильну чашку Петрі з невеликою кількістю поживної речовини і стерильним піпетом подрібнювали його на частки розміром з булавовидну голівку. За допомогою вигнутої препарувальної голки частинки біоптату виймають з поживної середовища і розміщують на покривному скельці, яке знаходиться у культуральному флаконі і накривають їх покривним скельцем, наливаючи поживну речовину таким чином, щоб вона закривала верхнє скельце. Покривні скельця за допомогою пінцету накладають на бокову сторону культурального флакону, щільно закривають пробкою і інкубують у термостаті при 37°C , через тиждень з добовою періодичністю проглядають культуру під мікроскопом, повертаючи флакон і досліджуючи прилиплі до бокової стінки скельця з культурою при малому збільшенні. При появі зони росту клітин змінюють середовище. Якщо клітини займають увесь простір між часточками, виготовляють клітинну суспензію фібробластів: видаляють поживну речовину із флакону і наливали підігрітий 0,25 % розчин трипсину на дві хвилини потім трипсин виливають, залишаючи його лише між скельцями та інкубують культуру протягом 20 хвилин у термостаті при 37°C і після закінчення трипсинізації відділяють одне скельце від іншого за допомогою препарувальної голки. За допомогою тонко відтягнутої

піпетки виконують змивання клітин невеликою кількістю (1 мл) поживного розчину, ретельно пікетуючи суспензію клітин. Для відмивки та підготовки роботи на проточному цитофлюориметрі клітинну суспензію переносять до центрифужної пробірки і центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв. Відбирають над осадову рідину, додають фосфатно-солевий буфер (рН 7,2), ресуспензують осад і знову центрифугують, двічі повторюючи відмивку клітин. До відмитого осаду додають фосфатно-солевий буфер, ресуспензують осад і розливають клітинну суспензію у еппендорфи по 0,1 мл. Склад фосфатно-солевого буферу рН 7,2 на 1л дистильованої води (NaCl - 7,82 г., KH_2PO_4 - 0,25 г., Na_2HPO_4 - 1,16г).

До двох пробірок по 0,1мл клітинної суспензії уФСБ додають 1,5 мкл флюорисцентного барвника-5-(6)- карбоксифлюорисцеїн-діацетат та інкубують при температурі 37°C продовж Юхвилин. Після цього клітини відмивають шляхом центрифугування з 1мл ФСБ при 1,5 тис. об/хв протягом 5хвилин. Потім ресуспензують клітини 1-й пробірці, фіксують 4% розчином параформальдегіду тривалістю 10 хв. при температурі 4°C . Пермабілізацію проводять за допомогою 0,1% розчину сапонину. Після 2-х разової відмивки клітини нкубують із 5 мкл антитіл до фибробластів при 37°C тривалістю 20 хв.

Після одноразової відмивки до ресуспензованих клітин додають 2 мкл 2-х позначених фикоеритрином. Інкубацію клітин проводять при 37°C тривалістю 209хв., до ресуспензованих клітин 1-ої пробіри додають 0,5 мл ФСБ і аналізують на проточному цитофлюориметрі.

До другої пробіри після інкубації с КФДА додають 0,2 мл поживного середовища і інкубують при 37°C протягом 48годин. Після вторинної відмивки процес повторюють з 2-го етапу сз наступним аналізом на проточному цитофлюориметрі.

Аналіз проводять на проточному цитофлюориметрі ERJX LX - MCL (Beckman Coulter, CIIA), з використанням програми System II tm software. Для збудження флюорисценції використовують аргонний лазер із довжиною хвилі 488нм. Додатково до флюорисцентних параметрів проводять реєстрацію прямого і бокового світлороссіявача клітин, що дозволяє виключити з аналізу конгломерати клітин та їх уламки. Підрахунок клітин проводять протягом 300 секунд, при цьому кількість проаналізованих клітин у пробі в пробі складає від 15 до 20 тис.

Імуногістохімічне дослідження фібробластів, отриманих із клітинної суспензії, проводять за допомогою моноклональних мишачих антитіл до фібробластів людини (Dako Cytomation, США).

Принцип імуногістохімічного дослідження полягає в імунологічній реакції моноклональних антитіл (мк АТ) КЛОН проти певного тканевого антигену. Первинний мк Ат визначали за допомогою вторинних антитіл, конюгованих із біотином проти Fc імуноглобулінів (EXTRA-2, Sigma, USA), потім зрізи обробляють стрептавідін пероксидазним комплексом, який прикріплюється до біотиніловим комплексам антиген-антитіло, розчепляють хромоген (аміноетилкарбазол, діамінобензидин (Sigma,

USA) і дає забарвлення в місці локалізації комплексу антиген-антитіло, що забезпечує візуалізацію реакції. Для гістологічного дослідження біоптат слизової оболонки порожнини рота фіксують у 10% розчині нейтрального формаліну і заключають у парафін по загальновідомій методиці. Зрізи депарафінують і забарвлюють гематоксилін-зозином та по Маллорі з наступним підрахуванням кількості фібробластів з урахуванням ступеню глибини присінку порожнини рота і проводять визначення ступеню проліферативної активності фібробластів, при підвищеному ступені проліферативної активності фібробластів у досліджуваному матеріалі, прогнозують можливість ускладнення, утворення рубцевої деформації після хірургічного втручання.

Приклад 1. Запропонований спосіб прогнозування ускладнень після хірургічної корекції мілкого присінку проводили пацієнту Н. 19 років, із зубощелепною аномалією, мілким присінком порожнини рота та гінгівітом. Після проведення комплексу клініко-діагностичних досліджень виконували інфільтраційну анестезію у ділянці прикріпленої частини ясен виконували забір досліджуваного матеріалу. Матеріал для дослідження одержують шляхом біопсії слизової оболонки в області прикріпленої частини ясен. Розмір біоптата 1,5х1,5мм. Біопсія проводиться поза зоною прикріплення вуздечки нижньої губи, відступаючи від неї на 3мм вправо. Потім одержаний біоптат розміщували у пробірку з

фізіологічним розчином і виконували імуногістохімічне та гістологічне дослідження відповідно до запропонованого способу. Імуногістохімічне дослідження фібробластів, виконували з клітинної суспензії біоптату, за допомогою реакції моноклональних мишачих антитіл до фібробластів людини (Dako Cytomation, США), гістологічне дослідження виконували після забарвлення зрізів гематоксилін-зозином та по Маллорі. Підраховували кількість фібробластів з урахуванням ступеню глибини присінку порожнини рота та визначали ступінь проліферативної активності фібробластів. У досліджуваному матеріалі було виявлено підвищену ступінь проліферативної активності фібробластів, що дає змогу прогнозувати можливість ускладнення, а саме, утворення рубцевої деформації після хірургічного втручання.

Запропонованим способом прогнозування ускладнень після хірургічної корекції мілкого присінку було досліджено 5 пацієнтів віком 18-25 років з наявністю зубощелепної аномалії, мілким присінком порожнини рота та гінгівітом. Всім пацієнтам до вестибулопластики проводили обстеження запропонованим способом, що дало змогу запобігти утворення рубцевої деформації після хірургічного втручання, шляхом своєчасного проведення профілактичних заходів.

Запропонований спосіб прогнозування достатньо інформативний і забезпечує високий ступінь достовірності прогнозування.