



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48519

(13) A

(51) 6 A61C17/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ПОРОЖНИНИ РОТА

1

2

(21) 2001096503

(22) 24 09 2001

(24) 15 08 2002

(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.

(72) Кайдашев Ігор Петрович, Ткаченко Павло Іванович, Куроедова Віра Дмитрівна, Карасюнок Оксана Олександрівна, Шинкевич Вікторія Ігорівна, Баштовенко Оксана Анатоліївна

(73) Кайдашев Ігор Петрович, Ткаченко Павло Іванович, Куроедова Віра Дмитрівна, Карасюнок Оксана Олександрівна, Шинкевич Вікторія Ігорівна, Баштовенко Оксана Анатоліївна

(57) Спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота, що включає відбір матеріалу, його обробку та оцінку, який відрізняється тим, що відбір матеріалу проводять із захопленням слизової оболонки разом із власною пластинкою, із матеріалу виготовляють зрізи, які обробляють антитілами до маркерів імункомпетентних клітин, а оцінка проводиться шляхом реєстрації їх кількості та взаєморозташування

Винахід відноситься до галузей біології й медицини та може бути використаний для оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота за нормальних умов, при різних стоматологічних захворюваннях та динамічного спостереження за станом хворих

Найбільш сучасними та інформативними способами оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота є методи, що базуються на послідовних полосканнях - міграції лейкоцитів у порожнину рота (Ясиновський, 1930) [Н.Ф. Данилевський, А.В. Борисенко Заболевания пародонта - Киев "Здоров'я" -2000 -462с], реакції адсорбції мікроорганізмів (Н.Ф. Данилевський, А.П. Самойлов, Т.А. Беленчук, 1985, Т.А. Беленчук 1985) [Н.Ф. Данилевський, А.В. Борисенко Заболевания пародонта -Киев "Здоров'я" -2000 -462с], люмінесцентному дослідженні [Данилевський М.Ф., Несин О.Ф., Рахній Ж.І. Захворювання слизової оболонки порожнини рота -Киев "Здоров'я" -1998 -С 35]. Вказані методи дозволяють охарактеризувати бар'єрну функцію слизової оболонки, ступінь фагоцитозу (його наявність, відсутність, незавершений фагоцитоз), характер запальної реакції, оцінити результати різних способів лікування захворювань пародонта та слизової оболонки порожнини рота, але не дозволяють отримати достатню інформацію щодо імунологічних процесів, які є ведучими в патогенезі цієї категорії хвороб

Найбільш близьким до способу, який заявляється є цитологічний метод дослідження епітелію

слизової оболонки порожнини рота [Данилевський М.Ф., Несин О.Ф., Рахній Ж.І. Захворювання слизової оболонки порожнини рота -Киев "Здоров'я" -1998 -408 с]

Для його здійснення матеріал дістається методом зскрібка, мазку, відбитка або перевідбитка (коли елемент враження слизової оболонки знаходиться в місцях, недоступних для одержання прямого відбитка), якщо і ці засоби неможливі, то препарат отримують із осаду ротової рідини. За допомогою шпателя чи тампона, переносять матеріал на предметне скло, фіксують та забарвлюють одним із прийнятих поліхромних (по Папаніколу, Романовському-Гімзе та ін.) або спеціальних методів

При вивченні препаратів виявляють такі клітинні елементи клітини гематогенного походження - нейтрофільні гранулоцити, еозинофіли, лімфоцити та ін., клітини гістогенного походження - фібробласти, гістоцити, плазмоцити тощо, клітини епітелію - зроговілі, схильні до зроговіння, атипові, акантолітичні (клітини Тцанка), специфічні клітини - типу Лангганса, епітеліоїдні, "монструозні", клітини герпесу. Крім того визначають мікроорганізми - коки, веретеноподібні бактерії, спирохети, гриби

Визначають якісне й кількісне співвідношення нейтрофільних гранулоцитів, активність фагоцитозу. Індекс кератинізації виявляє ступінь кератинізації. Для одержання індексу кератинізації обчислюють загальну кількість епітеліальних клітин у полі зору мікроскопа, потім кількість виявлених

(13) A
(11) 48519
(19) UA

зроговілих клітин множать на сто і ділять на їх загальне число. Зниження індексу кератинізації при динамічному обстеженні свідчить про спад захисної функції слизової оболонки.

Відповідно до цитологічної класифікації в епітелії порожнини рота вилучають базальні, парабазальні, проміжні та поверхневі клітини, а в ділянках, які піддаються зроговінню, - також і рогові лусочки.

Суттєвими недоліками цього методу є низька інформативність та низька достовірність, що обумовлені наступними обставинами.

1. Матеріал, що забирається для дослідження, знаходиться на поверхні епітелію і не може відображати функціональний стан глибше розташованих шарів.

2. Клітини, що можливо піддати дослідженню даним методом, знаходяться на останніх етапах життєдіяльності. Тому не можуть у повній мірі характеризувати живу тканину.

3. Внаслідок росту кількості алергічних захворювань слизової оболонки порожнини рота постає необхідність глибокого вивчення імунокомпетентних клітин, що неможливо досягти даним методом.

4. Даний метод взагалі не дозволяє виявити функціонально активні імунокомпетентні клітини, диференціювати їх та спостерігати взаємовідносини між ними.

В основу винаходу поставлено завдання підвищення інформативності та достовірності цитологічного методу. Поставлене завдання вирішується шляхом дослідження імунофенотипу активно функціонуючих клітин біоптатів слизової оболонки разом з власною пластинкою, що відбираються з визначених ділянок слизової оболонки порожнини рота.

Визначення антигену на тканинних зрізах імуногістохімічним (стрептавідін-пероксидазним) методом здійснюється наступним шляхом. Для дослідження поверхневих антигенів використовували зрізи товщиною 5 - 7 мкм, що їх отримували на

кріостаті і потім фіксували в охолодженому до -20°C ацетоні. Метод, що пропонується, включає три реакції і полягає у взаємодії антигена з антитілом. Спочатку тканинний антиген взаємодіє з первинними антитілами (мишачими), які є специфічними маркерами. Друга реакція відбувається між анти-мишачими та первинними антитілами, при цьому останні мічені біотином. Третя реакція проходить внаслідок взаємодії біотину зі стрептавідін-пероксидазою. Виявлення активності пероксидази проводилось з використанням діамінобензидина солянокислого. Кінцевим продуктом гістохімічної реакції є нерозчинний пігмент коричневого кольору, що випадає в місці знаходження антигену (зовнішня мембрана або цитоплазма клітини). Для оцінки експерименту проводять негативний контроль із нормальною мишачою сироваткою замість первинних антитіл. Негативний контроль не забарвлюється.

Оцінку результатів проводили порівнюючи інтенсивність забарвлення досліджуваних препаратів із негативним контролем. Інтенсивність забарвлення препаратів, по відношенню до контролю ендогенної пероксидази, була різною, що залежить від її рівня в тканинах.

Підрахунок імунних клітин, що проявили себе позитивною реакцією, проводився на 100 епітеліальних клітин по всій товщі пласта епітелію. У рахунок не брали забарвлені позитивно фрагменти клітин, які не мали ядерних структур.

Нами було досліджено слизову оболонку мілкого присінку порожнини рота у дітей із зубощелепними аномаліями віком 8-10 років на 26 інтраопераційних біоптатах, взятих під час вестибулопластики. Із них 12 біоптатів було взято у дітей, яким застосовували передопераційну підготовку електрофорезом екстракту алое (із метою покращення загоєння післяопераційної рани) та 14 - без застосування даного препарату.

Первинні моноклональні антитіла, використані у дослідженні наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Первинні антитіла	Експресія	Розведення	Кількість	Виробник
CD3	T-лімфоцити	1:5	5-10 мкл	"Сорбент" Москва
CD4	T-хелпери/індуктори	1:5	5-10 мкл	"Сорбент" Москва
CD8	T-кілери/супресори	1:5	5-10 мкл	"Сорбент" Москва
CD14	моноцити	1:5	5-10 мкл	Sigma, США
CD16	NK-клітини	1:5	5-10 мкл	"Сорбент" Москва
CD20	B-лімфоцити	1:5	5-10 мкл	"Сорбент" Москва
HLA-DR	Моноцити, B-клітини,	1:5	5-10 мкл	"Сорбент" Москва
	Активовані -клітини, дендритні АПК			

Отримані дані дозволили встановити локалізацію і кількість імунокомпетентних клітин в слизовій оболонці мілкого ППР.

Нами виявлено поодинокі CD3⁺-клітини, які локалізувались біля дистрофічно змінених епітеліоцитів.

Кількість CD4⁺-T-лімфоцитів в слизовій оболонці мілкого ППР складала 1 - 2 на 100 епітеліальних клітин, характерним було їх розташування в місцях близько до базальної мембрани.

CD8⁺-клітини в епітелії були малочислені, і

локалізовані здебільшого в базальному (9 на 100 епітеліоцитів) та шипуватому (6 клітин на 100 епітеліоцитів) шарах. Переважно ці клітини, розташовані на вершинах сосочків, утворених власною пластинкою епітеліальної оболонки.

У слизовій оболонці аномально прикріплених тканин ППР зустрічалося 4 - 5 CD14⁺-клітин на 100 епітеліоцитів. Вони розміщувалися по базальній мембрані.

CD16⁺-клітини у слизовій оболонці мілкого ППР майже не зустрічались.

Нами було виявлено поодинокі $CD20^+$ -клітини в товщі епітелію, локалізовані, в більшості випадків, під та над базальною мембраною, що пояснюється відсутністю гострих запальних процесів в досліджуваній ділянці слизової оболонки порожнини рота

В наших дослідженнях чіткою імуногістохімічною реакцією проявили себе $HLA-DR^+$ дендритні клітини, ідентифіковані за характерними відростками. Кількість дендритних клітин в епітелії слизової оболонки м'якого присінку порожнини рота складала 9-10 на 100 епітеліоцитів. Характерною була локалізація дендритних клітин в базальному, шипуватому та підшипованому шарах.

В даному випадку отримані дані свідчать про підвищення активності локального імунітету після підготовчої терапії екстрактом алое, що має важ-

ливе значення в процесі загоєння післяопераційної рани.

Після проведення електрофорезу в слизовій оболонці м'якого ППР з'явилися поодинокі $CD16^+$ клітини, що розташовувались в шипуватому шарі (5 - 8 на 100 епітеліоцитів).

Кількість і локалізація $CD3^+$, $CD4^+$ та $CD8^+$ після проведення терапії екстрактом алое, не змінювалась. Однак спостерігалось незначне збільшення $CD14^+$ та $CD20^+$ клітин, їх розміщення залишалось тим же.

Проведене нами дослідження слизової оболонки м'якого присінку порожнини рота запропонованим методом свідчить про зміни в імунологічному статусі слизової оболонки порожнини рота, які можливо фіксувати та піддавати моніторингу в процесі лікування.