



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **55368** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
A61B 10/00
A61C 13/00
G01N 33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СПАДКОВОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО ВИНИКНЕННЯ ТА СТУПЕНЯ ВАЖКОСТІ ПЕРЕБІГУ ПРОТЕЗНИХ СТОМАТИТІВ У ХВОРИХ ЗА АКТИВНІСТЬ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ГЕНОМУ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ

1

2

(21) u201007186

(22) 10.06.2010

(24) 10.12.2010

(46) 10.12.2010, Бюл. № 23, 2010 р.

(72) ПАЛІЙЧУК ІВАН ВАСИЛЬОВИЧ, КОВАЛЬЧУК
ЛАРИСА ЄВГЕНІВНА, ЧЕРНЮК НАТАЛІЯ ВОЛО-
ДИМИРІВНА, ЯСТРЕБОВА ОЛЬГА СТАНІСЛАВІВ-
НА, ПАЛІЙЧУК ВОЛОДИМИР ІВАНОВИЧ(73) ПАЛІЙЧУК ІВАН ВАСИЛЬОВИЧ, КОВАЛЬЧУК
ЛАРИСА ЄВГЕНІВНА, ЧЕРНЮК НАТАЛІЯ ВОЛО-
ДИМИРІВНА, ЯСТРЕБОВА ОЛЬГА СТАНІСЛАВІВ-
НА, ПАЛІЙЧУК ВОЛОДИМИР ІВАНОВИЧ

(57) Спосіб визначення спадкової схильності до виникнення та ступеня важкості перебігу протезних стоматитів у хворих за активністю функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові, який включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, який **відрізняється** тим, що додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів крові з визначенням індексів морфологічно змінених ядер та мікроядер.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до стоматології, і може бути використана для визначення спадкової схильності до виникнення та ступеня важкості перебігу протезних стоматитів у хворих за активністю функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові.

Відомо, що в нейтрофільних гранулоцитів крові можуть експресуватись гени, які кодують виконання фагоцитарних функцій, секрецію багатьох цитокінів [Hendrich B., Bickmore W. Human diseases with underlying defects in chromatin structure and modification //Hum. Mol. Genet. - 2001. - Vol. 10. - P. 2233-2242.]. Продовженням вищенаведених робіт було цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур [Є.М. Нейко, Н.В. Чернюк, Л.Є. Ковальчук, Бронхіальна астма: клініко-генетичні аспекти патогенезу, діагностики, лікування, профілактики, «Здоров'я», Київ, 2003, с. 53].

Найбільш близьким до корисної моделі, що заявляється є «Спосіб ранньої діагностики функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень», що включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, при цьому додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів крові з визначенням індексів хроматизації (співвідношення ядер з перевагою еухро-

матину до ядер з гетерохроматином), ядерцевого, гетеропікнотичної X-хромосоми та морфологічно змінених ядер (Патент на корисну модель №26789 від 10.10.2007р. Бюл. №16. Заявка №u2007 04785 від 28.04.2007р. Чернюк Н.В., Ковальчук Л.Є, Палійчук І.В.). Проте даний спосіб не дає змогу встановити спадкову схильність до протезних стоматитів.

В основу корисної моделі «Спосіб визначення спадкової схильності до виникнення та ступеня важкості перебігу протезних стоматитів у хворих за активністю функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові» поставлено задачу, створення об'єктивного способу визначення спадкової схильності до виникнення протезних стоматитів та ступеня важкості протікання протезних стоматитів у хворих шляхом лабораторного аналізу мазку крові та цитогенетичного дослідження нейтрофільних гранулоцитів з визначенням індексів морфологічно змінених ядер і мікроядер, які відображають порушення імуногенетичного статусу досліджуваної особи, генетичну нестабільність і схильність до захворювань. Це дозволить отримати об'єктивну оцінку функціональної активності генів на різних етапах реалізації спадкової інформації та виявити її залежність від важкості перебігу захворювання на ранній стадії у хворих з протезними стоматитами з метою створення групи ризику серед осіб, що потребують

(19) **UA** (11) **55368** (13) **U**

протезування, вибору раціональної терапії профілактики та попередження виникнення чи прогресування даного захворювання.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення спадкової схильності до виникнення та ступеня важкості перебігу протезних стоматитів у хворих за активністю функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові, включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, при цьому додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів крові з визначенням індексів морфологічно змінених ядер (патологічних ядер) та мікроядер.

Не викликає сумніву той факт, що метаболізм клітини залежить від морфо-функціональних особливостей ядра. Тому активність транскрипції і трансляції буде відрізнятися в нормальних і патологічно змінених ядрах. Це підтверджують визначені нами достовірні відмінності індексу патологічних ядер (ПЯ) усіх обстежених порівняно з таким у здорових людей. Варто зазначити, що навіть у контрольній групі осіб (генетично обтяжених і не обтяжених) з дефектами зубного ряду без ознак запального процесу індекс ПЯ зростав відповідно у 2,28 і 2,35 рази, порівняно з кількістю морфологічно змінених ядер в нормі. Частіше зустрічалися при протезних стоматитах (ПС) вакуолізовані ядра. Критерієм відбору для морфометрії були такі клітини, розмір ядер яких не зменшувався, а, навпаки, дещо збільшувався за відношенням до ядер основної клітинної популяції. Структура і забарвлення хроматину в ПЯ приблизно відповідала хроматину ядер в нормі або була гомогеннішою, вакуолі мали округлу форму. В цитоплазмі деяких клітин з'являлися вакуолі. Для диференціації вакуолізації ядер від стану конденсації хроматину, при якій також утворюються порожнини, що розділяють грудки і тяжі хроматину, враховано рекомендації про те, що ядро при гетерохроматизації не набухає, а навпаки, зморщується і хроматин стає темнішим і щільнішим [Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека /Л.П. Сычева //Медицинская генетика. - 2007. - Т.6. - №11 (65). - С. 3-11.]. Визначення вірогідних відмінностей ПЯ між різними групами пацієнтів показало достовірну різницю між алергічним ПС і спадково схильними до ПС. За різних типів захворювання морфологічні зміни ядер не мають специфічних характеристик і є універсальним індексом ступеня важкості захворювання. Ступень важкості захворювання залежить також від функціонального стану активності геному.

Виявлено поодинокі мікроядра при кандидозному та токсичному ПС з показниками деструкції. При цьому, у випадку токсичного ПС було зареєстровано клітини в процесі раннього некрозу. Вони були ідентифіковані за наявністю біло забарвленої цитоплазми з численними вакуолями і пошкодженою цитоплазматичною мембраною з доволі інтактним ядром. При алергічному ПС виявлено клітини на стадії пізнього некрозу: майже втрачена цитоплазма, пошкоджена каріолема, низька інтен-

сивність забарвлення ядра і цитоплазми. Вище описане підтверджує цитотоксичний механізм формування токсичного і алергічного ПС.

Поеднане вивчення вище вказаних індексів кариограми нейтрофільних гранулоцитів крові довело зниження активності першого та другого етапів реалізації генетичної інформації з порушенням регуляторних механізмів експресії генів при ПС.

Таким чином збільшення морфологічно змінених ядер, зниження активності функціонального стану геному можуть слугувати індексом ступеня важкості протікання протезних стоматитів у хворих та біомаркером спадкової схильності до виникнення протезних стоматитів.

Включення в комплексне обстеження пацієнтів з ПС цитогенетичного аналізу показників функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів крові дає змогу оцінити клітинні механізми порушення метаболізму, визначити критерії зворотних змін.

Набір хворих та визначення ступеня порушень спадкового апарату соматичних клітин проведено на кафедрі стоматології факультету післядипломної та кафедри медичної біології з курсом медичної генетики освіти Івано-Франківського національного медичного університету.

Обстежено 134 хворих, віком 62 ± 8 років, на протезні ПС: 34 особи з токсичним ПС, 37 з алергічним ПС, 30 з кандидозним ПС і 33 з комбінованим ПС протезними стоматитами. Контрольну групу склали 81 особа віком 50 ± 3 років, які мали дефекти зубних рядів без клінічних ознак прояву запалення слизової оболонки ротової порожнини. Цих пацієнтів було розділено на дві підгрупи (спадково схильні і спадково несхильні щодо ПС) залежно від наявності в родовах ПС, захворювання тканин пародонту та результатів мікробіологічних, дерматогліфічних досліджень. Обстежено також 45 здорових осіб (24 чоловіки і 21 жінка) зрілого віку (48 ± 3) з інтактними зубними рядами без супутньої патології.

Даний спосіб проводять наступним чином.

Для цитогенетичного дослідження у пацієнтів забирали 2,0 мл периферійної крові, виготовляли мазки крові, які після висушування доставлялись у генетичну лабораторію ЦНДЛ. Забарвлення ядер здійснювали за Фольгеном у модифікації Л.Є. Ковальчук і співавт. Функціональну активність геному встановлювали за морфологічними особливостями інтерфазних ядер нейтрофільних гранулоцитів. За розробленою нами методикою проводили і комплексний аналіз чотирьох індексів їх кариограми (хроматизації, ядерцевий, гетеропікнотичної X-хромосоми, морфологічно змінених ядер).

Препарати досліджували методом світлової мікроскопії за допомогою оптико-електронного комплексу Метаскан-2. У кожному препараті вивчали по 100 інтерфазних ядер з наступною оцінкою їх структурних характеристик.

Частоту патологічних ядер реєстрували за співвідношенням кількості нормальних ядер до таких зі зміненою структурою каріоплазми або каріолеми.

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень здійснювали за допомогою персонального комп'ютера та ліцензованих прикладних програм для роботи з електронними таблицями Microsoft Excel, і пакету "STATISTIKA 7,0".

Корисна модель дозволить здійснювати ранню діагностику схильності до протезного стоматиту у хворих до протезування знімними конструкціями зубних протезів ще до виникнення симптомів за-

хворювання, забезпечить отримання об'єктивної оцінки функціональної активності генів на різних етапах реалізації спадкової інформації та її залежність від важкості перебігу захворювання, що дозволить створити групи ризику серед осіб, що потребують протезування, вибору раціональної терапії профілактики та попередження виникнення чи прогресування даного захворювання.